

ÜBER DIE SYNTHETISCHE DARSTELLUNG DER
 α - BENZYL - GLYKOSIDE DER N - ACETYL - UND
N - GLYKOLYL - D - NEURAMINSÄURE

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der

Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

von

Monika Blohm

Rio de Janeiro - Brasilien

Bochum 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**ÜBER DIE SYNTHETISCHE DARSTELLUNG DER
 α - BENZYL - GLYKOSIDE DER N - ACETYL - UND
N - GLYKOLYL - D - NEURAMINSÄURE**

DISSERTATION

zur

**Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften**

der

**Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum**

von

Monika Blohm

Rio de Janeiro - Brasilien

Bochum 1967



Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1967

Referent: Prof. Dr. Hans Faillard

Korreferent: Prof. Dr. Günther Wilke

Dissertation eingereicht am: 3. Juli 1967

INHALTSVERZEICHNIS

=====

Seite

I. EINLEITUNG

1

II. THEORETISCHER TEIL

- A. Einführende Übersicht in die Stoff-
klasse der Zucker-Eiweiß-Komplexe 2
- B. Historischer Überblick über die Ent-
deckung und Isolierung der Neuramin-
säure 6
- C. Über die Konstitution der N-Acyl-neura-
aminsäure 11
- D. Über die Bindungsverhältnisse der Neura-
aminsäure am Heterosaccharidmolekül und
deren Spaltbarkeit 16
- E. Aufgabenstellung und Diskussion der Er-
gebnisse der Arbeit
 - 1. Über die angewandten Methoden zur
Darstellung eines durch Neuramini-
dase spaltbaren Glykosids 21
 - 2. Zu den Reaktionsmechanismen 24

III. EXPERIMENTELLER TEIL

- A. Darstellung des α -Benzyl-glykosids der
N-Acetyl- und N-Glykoly-D-neuramin-
säure
 - 1. Ausgangsmaterial: 3-tert.-Butyloxy-
carbonyl- β -lacton der N-Acyl-
neuraminsäuren 33
 - 2. Ausgangsmaterial: Kristallisierte
synthetisch dargestellte N-Glyko-
lyl-D-neuraminsäure 47
- B. Biologische und chemische Eigenschaf-
ten der synthetisch erhaltenen
 α -Benzyl-glykoside der N-Acyl-neura-
aminsäure
 - 1. Enzymatische Spaltung mit Neurami-
nidasen aus Clostridium perfrin-
gens und Vibrio cholerae 52
 - 2. HCl-Spaltung der N-Acyl-neuramin-
säure- α -benzyl-glykoside 59
 - 3. Alkali-Behandlung der α -Benzyl-
glykoside der N-Acyl-neuraminsäure
und ihrer entsprechenden Per-O-
Acetyl-Verbindungen 60

Seite

V. ZUSAMMENFASSUNG

61

V. LITERATURVERZEICHNIS

63

I. EINLEITUNG

=====

In der vorliegenden Arbeit wird die Darstellung synthetischer Substrate für Neuraminidasen aus *Chlostridium perfringens* und *Vibrio cholerae*, nämlich der α -Benzyl-glykoside der N-Acetyl- und N-Glykolyyl-D-neuraminsäure beschrieben.

II. THEORETISCHER TEIL

=====

A. Einführende Übersicht in die Stoffklasse der Zucker- Eiweiß-Komplexe.

Die Geschichte der N-Acyl-neuraminsäuren ist eng verbunden mit dem zunehmenden Interesse der Biochemiker an einer Klasse von Substanzen tierischen und menschlichen Ursprungs, den sogenannten "Schleimstoffen", auch Mucine oder Mucoide genannt. Es handelt sich bei diesen klaren, viskosen Sekreten um Konjugate aus Protein und Kohlenhydrat, eine Erkenntnis, zu der schon 1865 E. Eichwald (1) gekommen war. 1877 charakterisierte Hoppe-Seyler (2) in der von ihm begründeten Zeitschrift für "Physiologische Chemie" die Schleimstoffe des Schleimhautepithels und der Speicheldrüsen als eine "gallertig-gequollene, viskose Masse, sehr fein verteilbar in Wasser, aber nicht löslich darin, unlöslich in Äthanol, Äther, Chloroform, verdünnter Essigsäure und sehr verdünnten Mineralsäuren, leicht löslich in verdünnten Alkalien; aus diesen Lösungen durch Essigsäure oder vorsichtigen Zusatz von verdünnter Salzsäure fällbar und in konz. Essigsäure schwer löslich. Beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure oder Salzsäure zerfällt sie in Acidalbumin und einen Körper mit den Eigenschaften einer Säure, stärker als Kohlensäure, der in alkalischer Lösung erhitzt sich bräunt, Kupferoxyd, Wismutoxyd oder Indigoschwefelsäure reduziert, aber Stickstoff enthält und mit Bierhefe keine Alkoholgärung gibt."

Hier wird zum ersten Mal in der Literatur über die saure Natur des Kohlenhydratanteils dieser Klasse von Substanzen berichtet. Nach dem heutigen Wissen läßt sich diese Tatsache auf den hohen Gehalt an Neuraminsäure zurückführen.

Wir können nunmehr die schleimigen Substanzen nach chemischen Strukturgesichtspunkten in zwei Gruppen teilen: Die Glykoproteine (3) und die Mucopolysaccharide (4, 5). Bei beiden Stoffklassen handelt es sich um Konjugate aus Protein und Kohlenhydrat, die sich aber in der Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils und im Grundaufbau der Molekel unterscheiden.

Bei den Glykoproteinen ist die saure Komponente des Heterosaccharids die N-Acyl-neuraminsäure und bei der anderen Gruppe, den Mucopolysacchariden, die Uronsäure. Nach allen bisherigen Befunden schließen Neuraminsäuren und Uronsäuren als Bestandteil dieser beiden Kohlenhydrat-Peptid-Komplexe einander aus (3, 6).

In den Glykoproteinen, die stets entodermalen bzw. epithelialen Ursprungs sind, findet man die Kohlenhydratgruppen in covalenter Bindung (3) an das Protein vor, wobei die Heterosaccharide sich gewissermaßen in kammartiger Anordnung am Proteingerüst befinden.

Zu den Kohlenhydratbausteinen der Glykoproteine gehören die auch in den Mucopolysacchariden immer vorkommenden Hexosamine, nämlich die N-Acetylverbindungen von Glukosamin und Galaktosamin. Der Gehalt an Neutralzuckern wie Fucose, Galaktose und Mannose ist bei den verschiedenen Glykoproteinen unterschiedlich. Als charakteristischer Bestandteil dieser Substanzklasse fungieren die N-acylierten-D-Neuraminsäuren.

Die Zusammensetzung des Heterosaccharids aus den genannten Zucker-Komponenten ist von Organ zu Organ und von Tier zu Tier verschieden. Die kürzesten bisher bekannten Kohlenhydratketten weisen die Speicheldrüsen-Glykoproteine vom Schaf und Rind auf. Hier handelt es sich um ein Disaccharid (7), bestehend aus N-Acetyl-galaktosamin und N-Acyl-neuraminsäure. Beim Schweinesubmaxillarmucin kommt außer diesen Komponenten noch Galaktose, N-Acetyl-glukosamin und Fucose vor (8). Es liegt auf der Hand anzunehmen, daß bei hohem Kohlenhydratgehalt die Wahrscheinlichkeit, längere verzweigte oder unverzweigte Polysaccharidketten vorzufinden, groß ist. So soll das aus dem Harn isolierte Glykoprotein eine Kohlenhydratkette aus 17 Zuckereinheiten enthalten (9).

Die unterschiedliche Länge der Kohlenhydratketten der Glykoproteine findet auch ihren Niederschlag in der Nomenklatur. So bezeichnet man die nur ein kurzkettiges Heterosaccharid enthaltenden Glykoproteine der Speicheldrüsensekrete auch als Mucine, während man die kohlenhydratreichen Glykoproteine, die im Serum, Harn, Eiklar vorkommen, Mucoiden nennt. Besonders die Glykoproteine mit hohem Kohlenhydratgehalt zeigen vielfältige biologische Aktivitäten.

Auffallend im Kohlenhydrataufbau der Blutgruppen-aktiven Mucoiden ist der relativ hohe Gehalt an Fucose. Dagegen hat das Seromucoid, auch Orosomucoid genannt, sehr wenig Fucose, aber im Gegensatz zu den Blutgruppenmucoiden, neben einem hohen Neuraminsäuregehalt, auch relativ viel Mannose.

Die Neuraminsäure steht in der Kohlenhydratkette immer endständig, und als Bindeglieder sind bisher nur N-Acetyl-galaktosamin oder Galaktose bekannt (10). Sie wird schon bei milder Säure-Hydrolyse abgespalten.

Als Bindungsart der Heterosaccharidketten an das Protein werden bei den Glykoproteinen drei Möglichkeiten diskutiert, nämlich die einer N-Acyl-glykosylamin-Bindung mit der N-Amid-Gruppe des Asparagins (11), eine O-glykosidische Bindung zwischen der reduzierenden Gruppe des Heterosaccharids und der OH-Gruppe der Aminosäuren Serin oder Threonin (12, 13) und die einer O-glykosidischen Ester-Bindung zwischen der glykosidischen Gruppe des Zuckers und der ω -Carboxylgruppe der Aminosäuren Asparagin- und Glutaminsäure (14, 15).

Im Gegensatz zu den Glykoproteinen ist der Kohlenhydratanteil der Mucopolysaccharide, die hauptsächlich nur gewebs- oder zellständig (3) gefunden worden sind (z. B. in der Grundsubstanz des Bindegewebes und der Basalmembran von Endothelzellen), durch das Vorkommen von kleinen sich wiederholenden Untereinheiten (repeating units) von Zuckern mit hohem Polymerisationsgrad charakterisiert. So ist z. B. die Zahl der Disaccharid-Einheiten für den Kohlenhydrat-Protein-Komplex mit Hyaluronsäure (N-Acetyl-D-glukosamin + D-Glukuronsäure)ⁿ einige tausend, mit Chondroitinsulfat (Schwefelsäureester der N-Acetyl-D-galaktosamin + D-Glukuronsäure) über 160.

Zu dem Kohlenhydratanteil gehören hier die Hexosamine Glukosamin, N-Acetyl-glukosamin, N-Acetyl-galaktosamin, oft als Schwefelsäureester, die Neutralzucker Galaktose, Xylose, und als Gegenstück zu den Neuraminsäuren in den Glykoproteinen die Uronsäuren Glukuronsäure und Iduronsäure.

In manchen Mucopolysacchariden ist die Bindung zwischen Polysaccharid und Protein wie in den Glykoproteinen covalent (16), in anderen Mucopolysacchariden kann sie aber

auch eine pH-abhängige Ionenbindung zwischen basischen Proteingruppen und den Uronsäure- oder Schwefelsäuregruppen der Kohlenhydratkomponente sein (17).

B. Historischer Überblick über die Entdeckung und Isolierung der Neuraminsäure.

Dieses Kapitel wird 1936 eröffnet, als Blix (18) aus dem Rindersubmaxillarismucin durch Erhitzen mit Wasser eine Säure in kristallisierter Form erhielt, die reduzierende Eigenschaften aufwies und eine gut titrierbare Carboxylgruppe sowie zwei Acetylgruppen enthielt. Sie gab außerdem die sogenannte direkte und indirekte Ehrlich-Reaktion*, zersetzte sich durch kurzes Erwärmen mit verdünnter Mineralsäure unter Bildung von Huminkörpern und lieferte eine rot-violette Farbe mit dem Bial's-Orcinol Reagenz. Blix nahm an, ein acetyliertes, hexosaminhaltiges Disaccharid von saurem Charakter isoliert zu haben.

*1899 beobachtete Ehrlich, daß normaler, menschlicher Harn beim Erwärmen nach Zugabe von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Chlorwasserstoff eine rote Farbe gab. Neubauer (20) konnte beweisen, daß die im Harn vorkommenden Pyrrolkörper für diese Reaktion verantwortlich waren. Die Reaktion wurde als die direkte Ehrlich-Reaktion bekannt. Als indirekte Ehrlich-Reaktion bezeichnete Ehrlich (21) die Reaktion verschiedener Mucine, die nur nach einer Alkali-Vorbehandlung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd eine rote Farbe ergaben. Diese Reaktion ist allgemein kennzeichnend für 2-Acetamido-2-desoxyhexosen. Zur Bestimmung von nicht acylierten 2-Amino-2-desoxyhexosen wird die "Elson-Morgan" (22) Reaktion angewandt. Diese Substanzen geben die rote Farbe mit p-Dimethylaminobenzaldehyd erst nach vorheriger Kondensation mit Acetylaceton zu Pyrrolen in alkalischer Lösung.

Die gleichen Eigenschaften stellte Blix 1938 (19) bei bestimmten Lipoid-Fractionen des Ochsen-Hirns fest. Die Eigen-

schaft bestimmter Glykolipide (isoliert aus Pferde- und Rinder-Niere und Gehirn) beim Erwärmen mit Bial's-Reagenz eine auffallende rot-violette Farbe zu geben, wurde zum ersten Mal von Walz (23) und Levene und Landsteiner (24) (1927) beobachtet.

Im Jahre 1941 gelang es Klenk (25) bei der Spaltung eines Glykolipids mit methylalkoholischer Salzsäure das kristallisierende Methylglykosid einer die Bial-Reaktion ebenfalls mit der charakteristischen rot-violetten Farbe gebenden Substanz zu isolieren, die er als eine Polyhydroxyaminosäure ansprach. Die isolierte Substanz enthielt eine Carboxylgruppe, eine freie Aminogruppe und zeigte sich vollkommen stabil gegen Alkali, auch wenn die Lösung auf 100° C erwärmt wurde. Sie zeigte keine reduzierende Eigenschaften, aber gab die beschriebenen charakteristischen Reaktionen, nämlich die direkte und indirekte Ehrlich-Reaktion und die rot-violette Farbe mit Bial's Reagenz. Klenk gab dieser Polyhydroxyaminosäure wegen ihres Vorkommens im Nervengewebe den Namen Neuraminsäure. Dem die Neuraminsäure enthaltenden Glykolipoid, welches in menschlichem, normalem Gehirn in kleinen Mengen, hingegen aber bei der amaurotischen Idiotie vom Typ Tay-Sachs in beträchtlichen Mengen vorkommt (26), hatte Klenk den Namen Gangliosid gegeben. Bald darauf erkannte er (27), daß die Methoxylgruppe erst während der Methanolyse des Gangliosids in die Neuraminsäure eingetreten war, womit die Substanz richtiger als Methoxyneuraminsäure zu bezeichnen war. Im Verlauf seiner weiteren Untersuchungen (28) konnte Klenk beweisen, daß die Neuraminsäure kein Hexosamin enthält. Dieser Befund veranlaßte Blix und Mitarbeiter (29) ihre 1936 isolierte Substanz als das

Acetylderivat einer der Neuraminsäure ähnlichen Polyhydroxysäure anzusehen, und sie nannten sie wegen ihres Vorkommens in Speicheldrüsen Sialinsäure.

Hirst (30) lenkte, ausgehend von dem von ihm entdeckten Phaenomen der Virushämagglutination bei der Vermischung von Blut aus Hühnerembryonen mit virusinfizierter Allantoisflüssigkeit, das Interesse der Forschung auf die Glykoproteine. Er bemerkte auch (31), daß unter gewissen Bedingungen eine Elution des Virus von der Zelloberfläche stattfinden kann, eine Tatsache, die er auf eine enzymatische Reaktion zurückführte. Das Virus würde demnach das Enzym und die Zelloberfläche als als Rezeptor fungierende Substrat für das Virus enthalten. Aufbauend auf diesen Resultaten erkannte Burnet (32, 33), daß diese Virushämagglutination durch etliche Drüsenmucine menschlicher und tierischer Herkunft gehemmt werden kann. Er fand weiter, daß partiell hitzegeschädigte Viren (Indikator-Virus) noch mit den roten Blutkörperchen agglutinieren, jedoch die Fähigkeit verloren haben, von deren Oberfläche zu eluieren, also ihre enzymatische Aktivität eingebüßt haben. Aus Kulturen von Choleravibrionen isolierte Burnet (34) ein Enzym, welches die roten Blutkörperchen durch Abspaltung der Rezeptoren für nachfolgende Virusbehandlung inagglutinabel macht und auch die virushemmende Aktivität der nicht zellgebundenen Glykoproteine zerstört. Das Enzym wurde deshalb "receptor destroying enzyme" (RDE) genannt. Durch seine Einwirkung wird der Rezeptor für das Virus sowohl von der Zelloberfläche als auch von den Drüsenmucinen abgespalten.

Nach diesen gewonnenen Erkenntnissen stand die Frage um die chemische Natur des Zellrezeptors natürlich im Vordergrund. Gottschalk und Lind (35) gewannen im Jahre 1949 aus Ovomucin, einem als Virus-Hämagglutinations-Hemmstoff wirkenden Glykoprotein, eine stickstoffhaltige, niedrig-molekulare Verbindung einmal durch Einwirkung von RDE, zum anderen durch Einwirkung von Influenza A Virus Stamm Mel. Dieses enzymatische Spaltprodukt hatte reduzierende Eigenschaften, zersetzte sich unter Bildung von "Huminkörpern" beim Erwärmen mit verdünnter Mineralsäure und gab die charakteristische indirekte Ehrlich-Reaktion.

Eine Wiederholung der Gottschalkschen Versuche durch Odin (36) führte zu der weiteren Erkenntnis, daß das Spaltprodukt auch die direkte Ehrlich- und die Bial'sche-Reaktion gab. Er vermutete eine enge strukturelle Ähnlichkeit dieser Substanz mit der Klenkschen Neuraminsäure (27).

Im gleichen Jahr erhielten Klenk und Lauenstein (37) aus Rindersubmaxillarismucin und menschlichem Harnmucin durch Spaltung mit methanolischer HCl das kristallisierende Methylglykosid der Neuraminsäure, das sich nach den Analysen-Werten identisch mit dem aus Gangliosid (27) erhaltenen Produkt zeigte.

Zu dieser Zeit war ein Zusammenhang zwischen der "Sialinsäure" von Blix (29) und der Methoxyneuraminsäure von Klenk noch nicht einwandfrei erwiesen, da bei der letzteren die reduzierende Eigenschaft und die Acetylgruppen fehlten. Klenk und Faillard gelang es dann 1954 (38) durch hydrolytische Spaltung von Rindersubmaxillarismucin mit verdünnter HCl und fraktionierte Trennung des Spaltprodukts mittels Anionenaustauschern die N-Acetylverbindung der Neuramin-

säure in reiner kristalliner Form darzustellen. Durch Behandlung mit methanolischer HCl konnten sie die Acetylverbindung in die Methoxyneuraminsäure überführen und damit den Beweis der Identität dieser Substanzen erbringen. Von besonderem Interesse war die Feststellung, daß die N-Acetyl-neuraminsäure im Gegensatz zum Methylglykosid der Neuraminsäure schon beim Erhitzen mit verd. Alkali in Pyrrol- α -Carbonsäure übergeht (33).

Eine ihrem Verhalten nach sehr ähnliche Substanz wurde etwa zur gleichen Zeit von Kuhn und Brossmer (39) aus Kuhcolostrum isoliert. Sie gaben ihr den Namen Lactaminsäure. Ihre Identität mit den schon bekannten Verbindungen konnte nachgewiesen werden (40, 41).

Klenk, Faillard und Lempfrid (42) konnten dann auch durch Einwirkung von Influenzavirus (Stamm B-Lee) auf ein die Virushämagglutination stark hemmendes, menschliches Harnmucin N-Acetyl-neuraminsäure in kristallisierter Form erhalten. Daraus wurde geschlossen, daß die Zellrezeptoren für das Influenzavirus mit N-Acetyl-neuraminsäure identisch sind, oder daß doch zumindest die Eigenschaft eines Glykoproteins, als Virus-Rezeptor wirksam zu sein, von N-Acetyl-neuraminsäure determiniert wird.

Als ein weiteres Derivat der Neuraminsäure erhielten sowohl Blix und Mitarbeiter (43) als auch Klenk und Uhlenbruck (44) einmal durch milde Säure-Hydrolyse, zum anderen durch Einwirkung von RDE (aus *Vibrio cholerae*) auf Schweinesubmaxillarismucin eine N-Glykolyl-neuraminsäure. Auch verschiedene N-O-Diacetylverbindungen konnten Blix und Mitarbeiter (43) unter besonders milden Bedingungen aus dem Rinder- und Pferdesubmaxillarismucin isolieren. Die O-Acetyllewerden allerdings schon durch sehr geringe Säure-

konzentrationen abgespalten, weshalb ihre Isolierung ganz besondere Schwierigkeiten verursacht.

C. Über die Konstitution der N-Acyl-neuraminsäure.

An die Reindarstellung der Neuraminsäure schlossen sich Ende der 50er Jahre Versuche zur Strukturaufklärung an. Der erste Konstitutionsvorschlag stammte von Yamakawa (45) aus dem Jahre 1952, betraf das Methylglykosid und stellte eine neungliedrige, unverzweigte Kohlenstoffkette zur Diskussion. Blix und Mitarbeiter (1955, 1956) (43, 46) nahmen auf Grund der Elementaranalysen, der Perjodatoxydation, der Bestimmung der Hydroxylgruppen und der Tatsache, daß Neuraminsäure beim Erwärmen mit Alkali 2-Pyrrolcarbonsäure liefert, eine neungliedrige Kohlenstoffkette mit einer Ketogruppe an.

Der Formelvorschlag von Yamakawa konnte jedoch nicht in Einklang mit späteren Ergebnissen der Perjodatspaltung gebracht werden. Es wurden dabei 2 Mol Perjodat für die N-Acetyl-neuraminsäure und 3 Mol Perjodat für die Methoxy-neuraminsäure verbraucht. Es entstand neben einem Molekül Ameisensäure auch ein Molekül Formaldehyd (40).

Im selben Jahr stellten die Autoren Klenk, Faillard, Weygand und Schöne (40) einen anderen Formelvorschlag zur Diskussion. Der Verbrauch von 1 Mol Hypojodid bei der Aldosetitrations nach Willstätter-Schudel sowie das Auftreten einer α -Aminosäure nach Hypojodidoxydation mit anschließender Abspaltung der Acetylgruppe veranlaßte sie, die Struktur eines Erythritäthers einer N-Acetyl-Hexosaminuronsäure anzunehmen.

Aus den bisher geschilderten Ergebnissen der Struktur-Untersuchungen wurde die Gegenwart einiger Gruppen im N-Acetyl-neuraminsäure-Molekül eindeutig, nämlich die einer reduzierenden Gruppe, titrierbar mit Hypojodid nach Willstätter-Schudel, die einer Carboxylgruppe, die einer N-Acetylgruppe und die der fünf Hydroxylgruppen.

Gottschalk hatte 1955 (47) aufgrund rein theoretischer Beobachtungen einen Formelvorschlag aufgestellt, wonach die Neuraminsäure ein Aldolkondensationsprodukt aus Brenztraubensäure und 2-Desoxy-2-aminohexose ist. Mit diesem Formelvorschlag wollte Gottschalk in erster Linie die von Klenk und Faillard (33) gefundene, im alkalischen Milieu erfolgende Umwandlung von N-Acetyl-neuraminsäure in Pyrrol- α -Carbonsäure erklären.

Dieser Formelvorschlag stand im Einklang mit den Befunden von Kuhn (43). Dieser wollte die von Klenk, Faillard, Weygand und Schöne vorgeschlagene Formel auf seine aus Kuhcolostrum isolierte Lactaminsäure nachprüfen. Dazu verwendete er eine neue Methode von Deuel und Zweifel (49) zur Decarboxylierung von Uronsäure mit Pyridin in Gegenwart von Schwermetallionen (z. B. Ni-Acetat). Er erhielt dabei aber nicht das erwartete Decarboxylierungsprodukt, sondern N-Acetyl-D-glucosamin, sowie CO_2 und Acetaldehyd. Wenig später berichtete Zilliken (50) über die Isolierung von Brenztraubensäure neben N-Acetyl-D-glucosamin nach kurzer alkalischer Hydrolyse von N-Acetyl-neuraminsäure ohne Gegenwart von Schwermetallionen.

Heimer und Meyer (51) (1956) beschrieben fast zur gleichen Zeit die Spaltung der N-Acetyl-neuraminsäure zu N-Acetylglucosamin und Brenztraubensäure durch ein Enzym aus *Vibrio*

cholerae.

Als dann den Autoren Cornforth, Daines und Gottschalk (52) die Synthese der N-Acetyl-neuraminsäure durch Kondensation von N-Acetyl-D-glucosamin und Oxalelessigsäure glückte, schien die Formel für die Neuraminsäure endgültig bestätigt.

Gleichzeitig wurden auch die Befunde von Klenk und Faillard (40) verständlich, da das Auftreten einer α -Aminosäure nach der Willstätter-Schudel Oxydation auf eine Re-aldolisierung in dem alkalischen Milieu zurückzuführen ist.

Nach diesen Ergebnissen schien die sterische Konfiguration dieses C_3 -Moleküls an den C-Atomen 6, 7 und 3 festgelegt; sie entsprach den C-Atomen 3, 4 und 5 des N-Acetyl-glucosamins. Die noch ungeklärte sterische Anordnung an den C-Atomen 4 und 2 konnte von Kuhn und Brossmer (53) aufgeklärt werden. Diese Autoren nahmen an, daß die OH-Gruppe am C-Atom-4 der Neuraminsäure nach links gerichtet ist (in der Schreibweise von E. Fischer). Sie stützten sich dabei auf die Lactonregel von C.S. Hudson*; denn sowohl das Neuraminsäure-diäthylmercaptal-lacton ($\alpha_D = -83^\circ$), wie das daraus gewonnene Desthiolacton ($\alpha_D = -35^\circ$) waren linksdrehend. Darüber hinaus stellte Kuhn (53) fest, daß die N-Acetyl-neuraminsäure in Dimethylsulfoxyd Mutarotation von -115° nach -24° zeigt. Die kristalline Verbindung stellt also die aufwärts mutarotierende β -Form dar, womit die Konfiguration am C-Atom-2 geklärt wurde.

* C.S. Hudson (1910): Ein γ -Lacton, in dem der Sauerstoff auf der rechten Seite steht, ist stärker rechtsdrehend als die freie Säure. Steht der Ring auf der linken Seite, so ist das Lacton stärker linksdrehend.

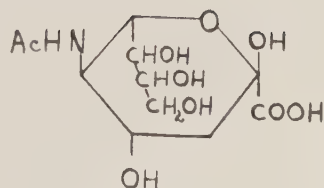
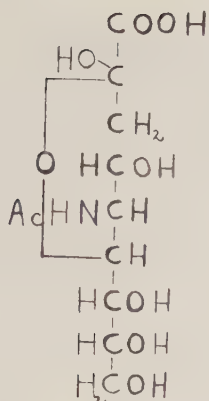
Überraschend war dann die Feststellung Rosemans (1950) (54), daß N-Acetyl-neuraminsäure durch ein aus Clostridium perfringens und E. coli erhaltenes Enzym in Brenztrauben-

säure und N-Acetyl-mannosamin an Stelle des erwarteten N-Acetyl-glucosamins gespalten wird. Da dieses Enzym nicht in der Lage ist, N-Acetyl-neuraminsäure durch Umkehrung der oben genannten Reaktion zu synthetisieren, wenn ihm N-Acetyl-glucosamin oder N-Acetyl-galaktosamin als Substrat angeboten werden, kann zwingend gefolgert werden, daß N-Acetyl-mannosamin der Baustein der Neuraminsäure ist. Dieses Enzym scheint jedoch bei der Biosynthese der Neuraminsäure keine Rolle zu spielen, was auch daraus erkennbar ist, daß es nur in Mikroorganismen (*Clostridium perfringens*, *E. coli*) gefunden wurde, die selbst keine Neuraminsäure enthalten.

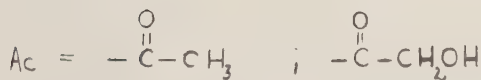
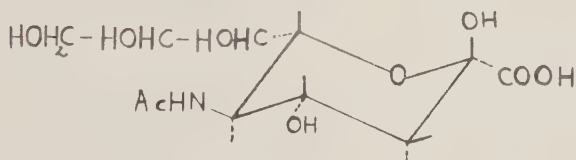
Die früheren Befunde der Strukturaufklärung konnten damit erklärt werden, daß sich unter alkalischen Bedingungen freies N-Acetyl-mannosamin und N-Acetyl-glucosamin durch Epimerisierung ineinander umwandeln (55, 56).

Einige Jahre später fanden dann noch Kuhn und Brossmer (57) aufgrund des durchgeführten Abbaus des Desthiolactons der Neuraminsäure mittels Perjodat und NaBH_4 zu R(-) -Pentatriol-(1.4.5.), daß das OH an C-Atom 4 nicht, wie sie früher annahmen, nach links, sondern entgegen der Hudsonschen Lactonregel nach rechts gerichtet sein mußte.

So wird heute der N-Acetyl-neuraminsäure, welcher der systematische Name 5-Acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-D-galaktosaminosäure zukommt, folgende Strukturformel zugeschrieben:



Rein aus theoretischen Überlegungen, die voraussagen, daß die Stabilität eines Moleküls durch die abstoßenden Kräfte zwischen den axialen Substituenten (bedingt durch die räumliche Nähe dieser Substituenten) herabgesetzt ist, nehmen wir für die Neuraminsäure eine ¹C₄-Konformation an, wobei alle großen Substituenten Äquatorial stehen.



2-D-N-Acyl-neuraminsäure

Die in den Glykoproteinen stets endständig mit ihrer glykosidischen OH-Gruppe in α -Position an das Heterosaccharid gebundene N-Acyl-neuraminsäure ist nicht nur kennzeichnend für die Stoffklasse der Glykoproteine, sondern sie ist determinierend für vielfältige biologische Eigenschaften der verschiedenen Glykoproteine. Die Gegenwart einer Carboxylgruppe ($pK_a = 2,6$), neben fünf Hydroxylgruppen und einer Acetamidogruppe im Neuraminsäuremolekül, erklärt die große Elektronegativität des Moleküls, da die Carboxylgruppe der Neuraminsäure stets frei und im physiologischen pH-Bereich negativ geladen ist.

D. Über die Bindungsverhältnisse der Neuraminsäure am Heterosaccharidmolekül und deren Spaltbarkeit.

Die erwähnte, stets terminale ketosidische Bindung der Acyl-neuraminsäuren an Galaktose oder N-Acetyl-galaktosamin-Resten ist säurelabil und enzymatisch durch Neuraminidase * spaltbar (58).

* System-Name: N-Acetylneuraminat-Glykohydrolase.

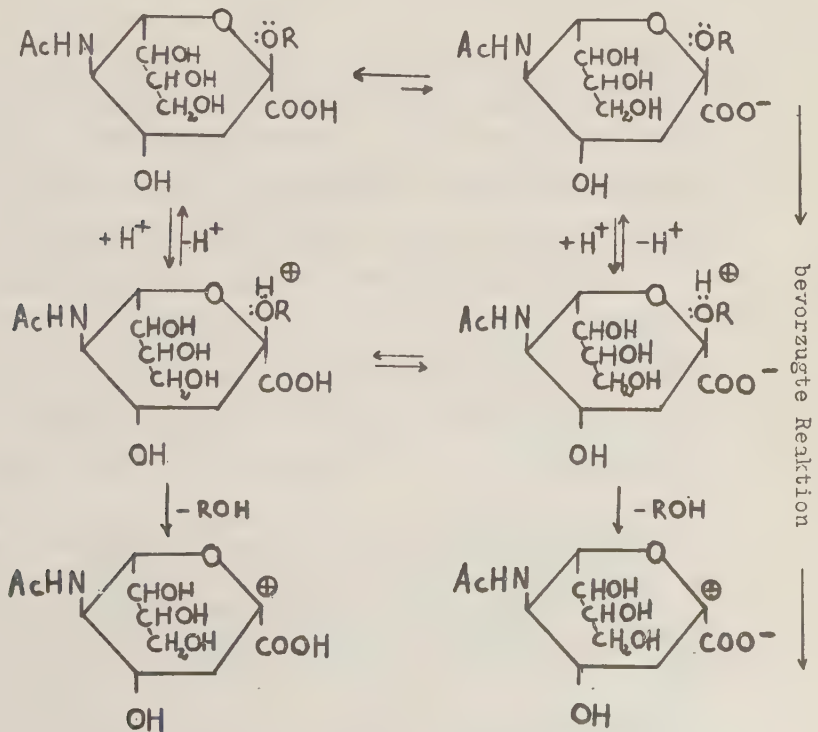
Die leichte Abspaltbarkeit der Neuraminsäure durch Säure ist aus ihrer chemischen Struktur verständlich. Sie verhält sich ähnlich wie 2-Desoxy-Zucker (59), deren Glykoside leichter hydrolysiert werden als die entsprechenden Derivate der normalen Zucker (60), und außerdem handelt es sich bei den Glykosiden der Neuraminsäure um Ketoside, die allgemein leichter hydrolysierbar sind als Aldopyranoside (61).

Es werden zwei Mechanismen diskutiert:

Gottschalk (62) nimmt als ersten Schritt der Reaktion der

Säurespaltung bei den meisten Glykosiden die Anlagerung eines Protons an das glykosidische Sauerstoffatom an. In dem pH-Bereich der Spaltung liegt die ionisierte Form zwar nur in geringer Menge vor, aber sie wird trotzdem zur Addition des Protons bevorzugt, erstens durch den positiv Induktiven-Effekt (+I) des dissoziierten Carboxylsauerstoffs, und zum anderen kann sich das intermediär gebildete Zwitterion durch die Nähe der negativen Ladung der Carboxylgruppe schneller in das Carboniumion umwandeln als das durch eine Addition von H^+ an die nicht dissoziierte Form erhaltene Kation.

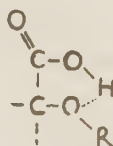
Die diskutierten Reaktionen der säurehydrolytischen Spaltung lassen sich folgendermaßen veranschaulichen:



Dieser Mechanismus würde auch die nachgewiesene größere Stabilität der Glykoside der Neuraminsäureester gegen Säure erklären (63).

Karkas und Chargaff (63) diskutieren einen anderen Mechanismus: Sie stellen sich die primäre Bildung einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der OH-Gruppe der Carboxylgruppe und dem glykosidischen Sauerstoffatom vor.

Der katalytische Effekt dieser Bindung, die beim Ester nicht möglich ist, beeinflusst die Geschwindigkeit der Säurespaltung.



Enzymatisch läßt sich die glykosidische Bindung der Neuraminsäure an Galaktose oder N-Acetyl-galaktosamin durch das vorne bereits erwähnte Enzym Neuraminidase spalten. Dieses früher receptor destroying enzyme (RDE) genannte Enzym wurde bisher in Choleravibrionen, Clostridium perfringens und anderen Bakterien (64), sowie in Influenza- und anderen Myxoviren gefunden (65). In geringer Menge werden diese Enzyme auch in Geweben und Körperflüssigkeiten von Vertebraten angetroffen (66).

Unter den bisher bekannten, natürlich vorkommenden N-Acetyl-D-neuraminsäure enthaltenden und durch Neuraminidase spaltbaren Substanzen hat das aus der Brustdrüse der Ratte (67, 68) und aus Colostrum (69) isolierte Trisaccharid N-Acetyl-neuraminsäure-lactose das niedrigste Molekulargewicht und den einfachsten Bau.

Von synthetischen Glykosiden der Neuraminsäure mit niedermolekularen Aglykonen war bislang nur das Methylglykosid (38, 25), das sich leicht in kristallisierter Form durch Umsetzung von N-Acetyl- oder N-Glykolylnneuraminsäure mit methanolischer HCl (unter Abspaltung der N-Acyl-Gruppen) gewinnen läßt, sowie das nicht kristallisierende N-Acetyl-D-neuraminsäure-methylketosid (43) bekannt. Die zuletzt genannte Verbindung konnte durch Erwärmen von N-Acetylneuraminsäure mit trockenem Methanol in Gegenwart von Dowex-50 und durch nachfolgende milde Verseifung des zunächst entstandenen Methylketosids des N-Acetyl-D-neuraminsäuremethylesters dargestellt werden.

Diese beiden Methylglykoside erwiesen sich aber als durch Neuraminidase nicht spaltbar (63, 70).

Die Frage, ob die Verknüpfung der Neuraminsäure in den natürlich vorkommenden spaltbaren Heterosacchariden der Glykoproteine eine α - oder β -glykosidische ist und ob dementsprechend die Neuraminidasen als α - oder β -Ketosidasen wirken, konnte bis dahin nicht zweifelsfrei geklärt werden. Zwar hatten Kuhn und Brossmer (69) in dem von ihnen aus Kuh-Colostrum isolierten Trisaccharid (N-Acetylneuraminyl-lactose) das Vorliegen einer α -ketosidischen Bindung zwischen der N-Acetylneuraminsäure und der Galaktose angenommen, waren aber zu dieser Annahme nur durch Analogieschlüsse gekommen. Sie gingen davon aus, daß α -Methyl-D-fructopyranosid die Ebene des polarisierten Lichtes nur wenig nach rechts, dagegen das β -Methyl-D-fructopyranosid sehr stark und zwar noch bedeutend stärker als freie β -D-Fructose, nach links dreht.

Der Vergleich des Drehvermögens des Trisaccharids N-Acetyl-

D-neuraminyl-lactose ($+6^{\circ}$ in Dimethylsulfoxyd) mit demjenigen der Lactose führte in Analogie zu dem genannten Beispiel zur Annahme einer α -glykosidischen Bindung zwischen N-Acetyl-D-neuraminsäure und der Lactose. Bei β -ketosidischer Bindung hätte nach Meinung der Autoren die N-Acetyl-D-neuraminyl-lactose linksdrehend sein müssen.

Die Notwendigkeit der chemischen Synthese solcher durch Neuraminidasen spaltbarer Substanzen war daher gegeben. Erstmals berichteten kürzlich Tuppy und Meindl (71) über die synthetische Darstellung mehrerer durch Neuraminidase spaltbarer N-Acetyl-D-neuraminsäure-glykoside. Zu ihrer Synthese wurde das 1901 von Koenigs und Knorr (72) eingeführte und seither vielfach modifizierte und verbesserte allgemeine Verfahren zur Darstellung von Glykosiden angewendet.

Die N-Acetyl-D-neuraminsäure, aus Meconium isoliert, wurde über ihr peracetyliertes Glykosylchlorid mit Alkoholen und einem säurebindenden Mittel (Silbercarbonat oder Silberoxyd) in die N-Acetyl-D-neuraminsäure-glykoside übergeführt.

Andererseits berichteten diese Autoren darüber (73), daß sie durch Erhitzen von N-Acetyl-neuraminsäure mit chlorwasserstoffhaltigem Amyl- und Hexylalkohol Glykoside erhielten, die nicht durch Neuraminidase spaltbar waren. Aufgrund optischer Vergleiche der anomeren Paare von Amyl- und Hexyl-ketosiden der N-Acetyl-D-neuraminsäure unter Heranziehung der Hudsonschen Regel* wurde den durch Neuraminidase spaltbaren Glykosiden die α -Konfiguration zugeschrieben, wodurch die Neuraminidasen als α -Ketosidasen anzusehen sind. Auf gleichem Wege gewannen auch Kuhn und Mitarbeiter (74) ein anomeres Paar, nämlich den Methylester des Methyl-

* In der D-Reihe stellt die α -Form stets das stärker rechtsdrehende Anomer dar.

glykosids der N-Acetyl-D-neuraminsäure. Auch hier erwies sich nur die weniger stark linksdrehende Verbindung, also das γ -Ketosid, als enzymatisch spaltbar.

E. Aufgabenstellung und Diskussion der Ergebnisse der Arbeit.

1. Über die angewandten Methoden zur Darstellung eines durch Neuraminidase spaltbaren Glykosids.

Unabhängig von den genannten Arbeiten (71, 73, 74, 75), die erst während der Anfertigung dieser Dissertation bekannt wurden, setzten wir uns zum Ziel, ein spaltbares Substrat für die Neuraminidase vollsynthetisch darzustellen. Während Tuppy und Mitarbeiter von N-Acetyl bzw. N-Glykolyl-neuraminsäure ausgingen, die aus Meconium bzw. Schweinesubmaxillarmucin gewonnen waren, dienten uns als Ausgangsmaterial die synthetisch erhaltenen N-Acetyl- und N-Glykolyl-D-neuraminsäuren (76, 77), wobei wir auch versuchten, direkt von dem bei der Synthese anfallenden Zwischenprodukt, dem N-Acyl-D-neuraminsäure- γ -lacton, zu einem Glykosid der Neuraminsäure zu gelangen. Als Methode benutzten wir das Verfahren von Koenigs und Knorr (72):

Die oben genannten Ausgangssubstanzen ließen sich mit Hilfe von Acetanhydrid in Gegenwart von Pyridin oder auch des sauren Katalysators $ZnCl_2$ leicht peracetylieren. Die 2.4.7.8.9.Penta-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure (71), die 2.4.7.3.9.Penta-O-acetyl-N-glykolyl-O-acetyl-D-neuraminsäure (76) und das 2.6.7.3.9.Penta-O-acetyl-neuraminsäure- γ -lacton (78, 79) konnten nicht kristallisiert, sondern nur als amorphe

Pulver, jedoch in chromatographisch einheitlicher Form erhalten werden.

Diese peracetylierten Verbindungen wurden durch Einleiten von Chlorwasserstoff in ihre Essigsäureanhydrid/Eisessiglösung am C-Atom-2 chloriert. Nach Abdampfen der Lösungsmittel und Gefriertrocknung aus Eisessig fielen amorphe Substanzen an, die sich schon bei Raumtemperatur durch Erniedrigung ihres Chlorgehaltes zersetzten. Es handelt sich hier bei den Umsetzungen mit Neuraminsäuren um Glykosylhalide (71, 75), nämlich um die 4.7.8.9.Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlor-D-neuraminsäuren und bei Umsetzungen mit den entsprechenden Lactonen um die 6.7.8.9.Tetra-O-acetyl-N-acetyl-2-chlor-neuraminsäure- γ -lactone. Analog dieser letzten Verbindung ist in der Literatur (30) das 3-Chlor-2-oxo-furandihydrid-(2.5) beschrieben.

Zur Umsetzung der Chlorverbindungen zu Benzylglykosiden der Neuraminsäure wurden sie mit Benzylalkohol in Gegenwart von frisch gefälltem Silbercarbonat und Drierite R behandelt. Nach Verseifung der O-Acetyl-gruppen mit verdünntem wässrigem Alkali, und zusätzlich bei dem umgesetzten Lactonderivat, nach Öffnung des Lactonringes, erhielten wir als Hauptprodukt das α -Benzyl-glykosid der N-Acetyl- bzw. N-Glykoly-neuraminsäure.

Zur besseren Erkennung des Erfolgs der Synthese setzten wir in einem Parallelversuch (1-¹⁴C) markierten Benzylalkohol ein. Im Radioautogramm konnte das Glykosid nach Verseifung des Reaktionsproduktes am Auftreten einer radioaktiv markierten Substanz erkannt werden, die gleichzeitig die für die Acyl-neuraminsäuren spezifische Farbreaktion mit Bial's-Reagenz gab.

Das Reaktionsgemisch wurde über eine Cellulosesäule MN 2100 ff fraktioniert und das α -Benzyl-glykosid der N-Acetyl- bzw. N-Glykoly-D-neuraminsäure auf diesem Wege rein isoliert. Diese Produkte konnten aber nicht kristallin, sondern nur als stark hygroskopische, amorphe Substanzen erhalten werden.

Zur Charakterisierung wurden die erhaltenen Verbindungen durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid und Pyridin zu den entsprechenden 4.7.9-Tetra-O-acetyl Derivaten umgesetzt, die in Wasser schwer löslich sind und die wir kristallin isolieren konnten.

Die dargestellten α -Benzyl-ketoside der N-Acyl-neuraminsäuren erwiesen sich als durch Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens* spaltbar. Die bei der enzymatischen Spaltung freigesetzten N-Acyl-neuraminsäuren konnten chromatographisch nachgewiesen und identifiziert werden. Die Michaelis-Menten-Konstante wurde für das α -Benzyl-glykosid der N-Acetyl-neuraminsäure bestimmt. Bei einem pH-Wert von 4,9 fanden wir eine $K_M = 1,9 \cdot 10^{-3}$ Mol/l bei Anwendung von hoch gereinigter Neuraminidase, die wir aus *Clostridium perfringens* isolieren konnten (31).

Nach der Per-O-acetylierung verlieren nach unseren Feststellungen die α -Ketoside die Eigenschaft der Spaltbarkeit durch Neuraminidase. Dies ist insofern eine interessante Beobachtung, als selbst die in Glykoproteinen vorkommende Tri-O-acetyl-D-neuraminsäure durch RDE noch gespalten wird (32).

Die glykosidische Bindung in den erhaltenen α -Benzyl-glykosiden der N-Acyl-neuraminsäuren wird auch durch Säure-Einwirkung gespalten. Gegen Alkali ist diese Bindung stabil, die Substanz verhält sich wie ein Acetal. Dagegen

werden die Per-O-acetyl- α -benzyl-glykoside schon durch mildes Alkali zu den entsprechenden α -Ketosiden verseift.

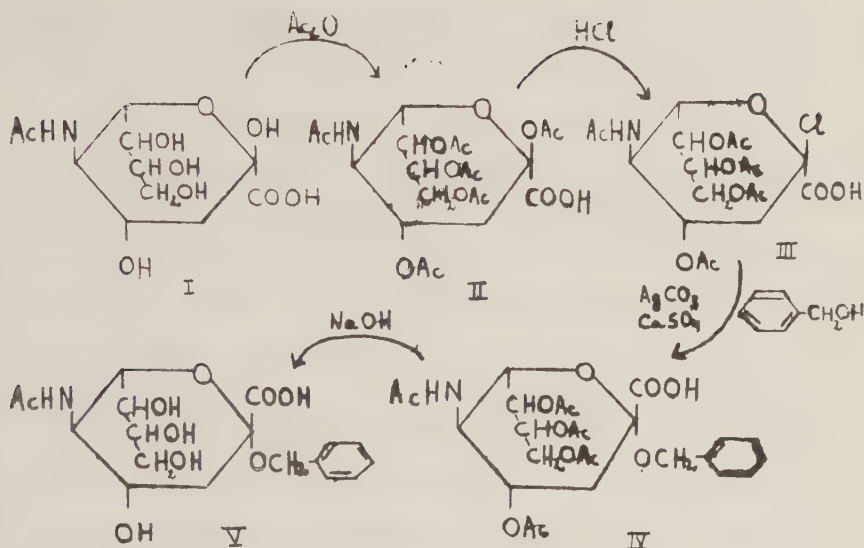
Zu den Eigenschaften der erhaltenen Verbindungen wäre noch zu sagen, daß sie wie die Neuraminsäuren die charakteristische Farbe mit Bial's Reagenz geben, was verständlich ist, da unter den stark sauren Bedingungen dieser Reaktion das Aglykon leicht abgespalten wird.

Dagegen geben die α -Benzyl-glykoside in der Thiobarbitursäure-Reaktion nach Aminoff (70) im Vergleich mit einer vorausgegangenen hydrolytischen Spaltung zu "freier" N-Acylneuraminsäure einen colorimetrischen Wert von nur 16 %. Bei den Glykosiden ist demnach die Oxydation zu 3-Formyl-brenztraubensäure (Chromogen der Reaktion mit Thiobarbitursäure) unter Verbrauch von einem dritten Mol Perjodat erst nach Abspaltung des Aglykons möglich. Ein Teil der glykosidischen Bindung dieser α -Benzyl-glykoside wird bei dieser Reaktion hydrolysiert, was die erhaltene geringe Extinction erklärt. Natürlich gebundene Neuraminsäure an Galaktose oder N-Acetyl-galaktosamin und das synthetisch erhaltene Methylglykosid der Neuraminsäure geben die Aminoff-Reaktion nicht. Deswegen wird diese Methode zur Bestimmung von durch Neuraminidase abgespaltenen Neuraminsäure angewandt, da nur "freie" Neuraminsäure erfasst werden kann.

2. Zu den Reaktionsmechanismen:

- a.) N-Acetyl- bzw. N-Glykoly-D-neuraminsäure als Ausgangsprodukt.

Eine Übersicht über die Reaktionsfolge gibt das folgende Schema:



Die N-Acyl-neuraminsäure liegt, wie schon erwähnt worden ist, als freie Säure in der β -Form vor. In der $1C_4$ -Konformation befinden sich alle großen Substituenten in Position äquatorial.

Durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Pyridin werden die OH-Gruppen ohne weitere Veränderungen im Molekül acetyliert.

In dem nächsten Schritt wird die Per-O-Acetyl-Verbindung chloriert, wobei die Cyclohalbacetal-Acetoxygruppe durch Chlor zu dem entsprechenden Glykosylhalid substituiert wird.

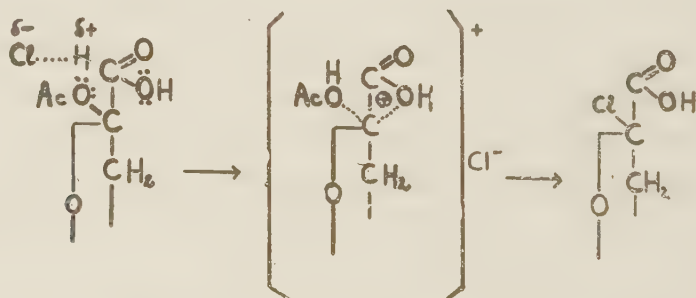
Es wurden keinerlei kinetische Untersuchungen gemacht. Der unten diskutierte Mechanismus ist lediglich ein Vorschlag zur Erklärung der durchgeführten Reaktionen und der erhaltenen Produkte.

Aufgrund des erhaltenen Endprodukts (α -Benzyl-glykosid der N-Acyl-neuraminsäure) muß der Reaktionsschritt 1-2

Chlorierung mit einer Erhaltung der Konfiguration des Ausgangsprodukts ablaufen.

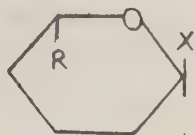
Wir nehmen an, daß zunächst die Acetoxygruppe an C-Atom-2 protoniert wird, wonach sich durch Austritt dieser Gruppe (die das Bindungselektronenpaar mitnimmt) ein intermediäres Carbonium bilden könnte.

Die Konfigurationserhaltung läßt sich erklären durch den Einfluß der nucleophilen Carboxylgruppe in Nachbarstellung zur austretenden Gruppe. Mit Loslösung der Acetoxygruppe würde synchron die Bildung eines α -Lactons erfolgen, in welchem die Carboxylgruppe durch eine elektrostatische Bindung das hypothetische Carboniumion in der für den nachfolgenden Angriff des Chlors "richtigen" Lage halten würde. Anschließend kann das Chlor von der gleichen Seite der austretenden Gruppe angreifen. Dadurch bleibt die β -Konfiguration der N-Acyl-neuraminsäure in dem Chlorderivat erhalten.

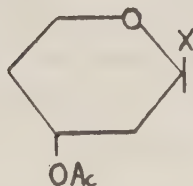


Stereochemische Überlegungen, welche in zwei Regeln dargestellt worden sind (83) (vergleiche nachfolgende Abbildung), stützen unsere Annahme des Vorliegens des β -Anomers des Glykosylhalids der Neuraminsäure, da sowohl die Acetoxygruppe am C-Atom-3 als auch der Rest am C-Atom-5 in

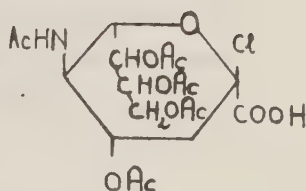
trans-Position zu dem Halogenatom am C-Atom-1 des Pyran-
rings stehen.



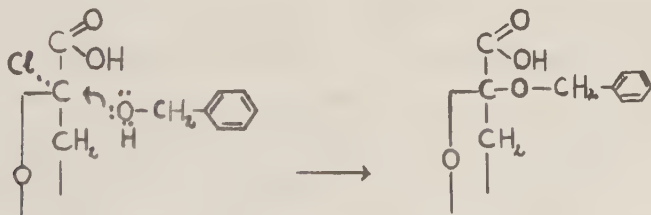
1. Regel



2. Regel

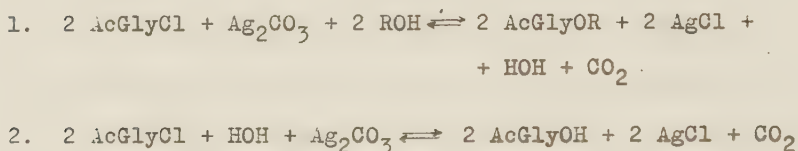


Das β -Glykosylhalid lässt sich dann in Gegenwart von Ben-
zylalkohol und Silbercarbonat als Katalysator in das α -
Benzylglykosid der N-Acyl-neuraminsäure umsetzen. Die
Koenigs-Knorr-Synthese verläuft mit einer Konfigurations-
umkehr (Waldensche Umkehr).



Die benzylalkoholischen OH-Gruppen des Mediums können das
Chlor-Ion solvatisieren, indem sie Wasserstoffbrücken-
bindungen ausbilden. Man kann sich im übertragenen Sinne
vorstellen, daß die Alkoholmolek le am Chlor-Ion "ziehen",
und daß diese "ziehende Wirkung" bei Halogenid-Substitu-
tionen zusätzlich durch die stark elektrophilen Silber-
ionenverst rkt wird; dabei bildet sich ein unlösliches
Silberhalogenid.

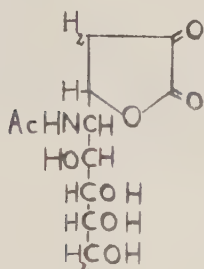
Der Benzylalkohol greift gleichzeitig den "elektronen-armen" Kohlenstoff von der Rückseite her an, und wir erhalten das Produkt unter Konfigurationsumkehr. Zur Verhinderung der möglichen Reaktion (2), bei der das in der Reaktion entstandene Wasser eine Rück-Reaktion zur glykosidischen OH-Gruppe der Neuraminsäure bedingt, wird CaSO_4 (Drierite) zugefügt.



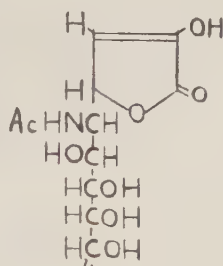
b.) N-Acyl-D-neuraminsäure- γ -lacton als Ausgangsmaterial:

In Anlehnung an die Vorschriften von Kuhn und Bashang (76) und Faillard und Blohm (77) wird durch Kondensation des Kaliumsalzes des Oxalessigsäure-di-tert.-butylesters mit 4.6.-Benzyliden-N-acetyl- bzw. N-Glykolyglucosamin das 3-tert.-Butyloxycarbonyl-7.9.-benzyliden-N-acetyl- bzw. N-Glykolyl-neuraminsäure- γ -lacton erhalten. Nach Abhydrieren der Benzyliden-Gruppe gewannen Kuhn und Bashang das N-Acetyl-3-tert.-butyloxycarbonyl-neuraminsäure- γ -lacton als ein amorphes Pulver (76). Wir konnten das 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Glykolyl-neuraminsäure als eine farblose, kristalline Substanz isolieren. Durch Erhitzen auf $90-100^\circ \text{C}$ in wässriger Lösung zerfallen diese 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lactone der Neuraminsäure unter Abspaltung von Isobutylen und CO_2 zu den entsprechenden γ -Lactonen der N-Acyl-neuraminsäuren. Diese

Verbindungen konnten jedoch nur amorph erhalten werden. Kuhn und Bashang (76) postulieren für ihr γ -Lacton der N-Acetyl-neuraminsäure Struktur I bzw. Struktur II, konnten aber durch Ozonolyse keinen eindeutigen Beweis ihrer Annahme liefern.

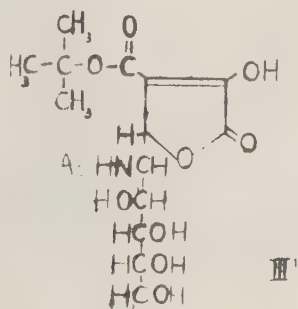


I

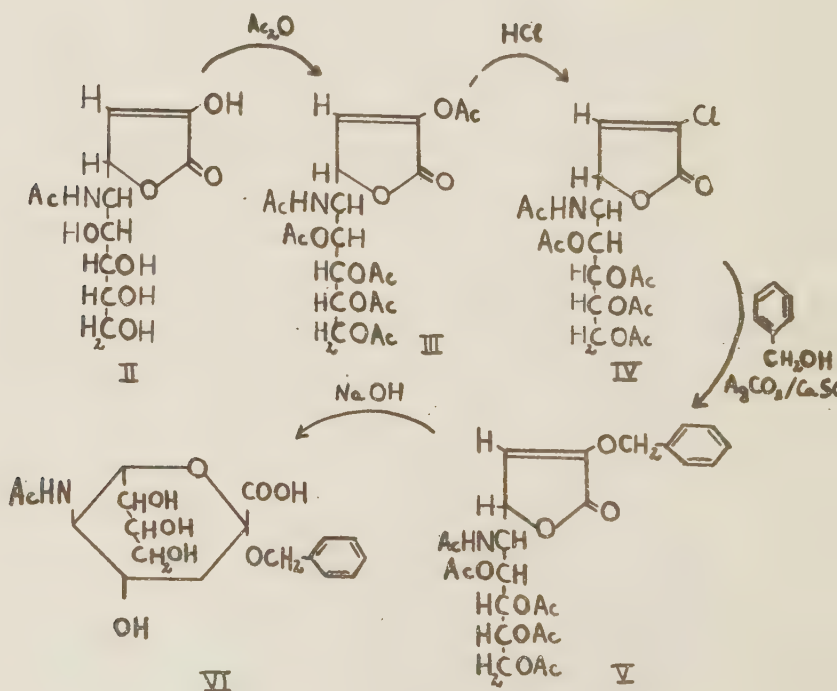


II

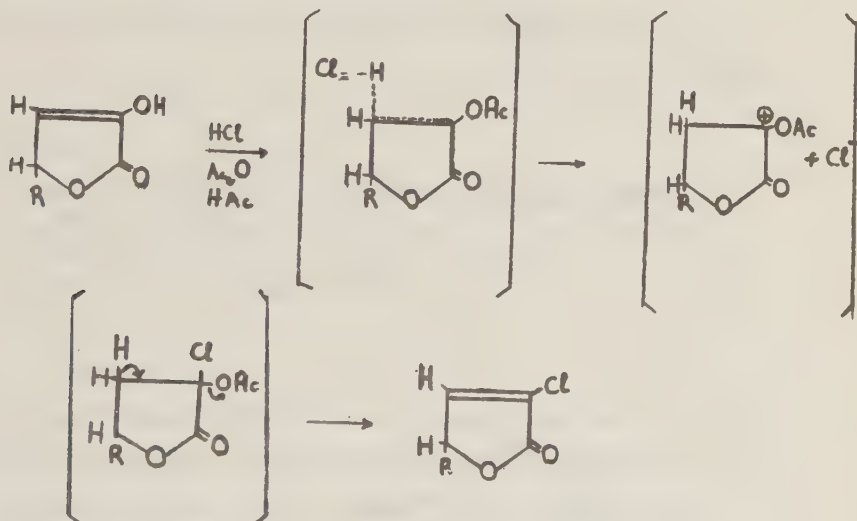
Wir konnten diesen Strukturvorschlag durch die erhaltenen Analysenwerte und das IR-Spektrum für die kristallisierte Substanz III', die ja eine direkte Vorstufe des γ -Lactons ist, bestätigen.



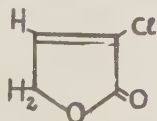
In der Literatur (34) ist eine ähnliche Verbindung bekannt, das α -Oxo-butyro-lacton, das sich lediglich von dem Neuraminsäure-lacton durch Fehlen der Seitenkette an C-Atom-4 unterscheidet und für das eine Enolisierung beschrieben ist. Es darf analog dieser Feststellung auch eine Enolisierung für die Neuraminsäure angenommen werden. Als weitere Stütze dieses Analogieschlusses kann außerdem das 1.2.-Cyclopentandion, das fast vollständig enolisiert ist (35), herangezogen werden. Um von diesem Lacton zum α -Benzyl-glykosid der Neuraminsäure zu gelangen, sind folgende Reaktionsschritte erforderlich:



Die Acetylierung der Hydroxylgruppen wird mit Essigsäureanhydrid in Gegenwart von Pyridin durchgeführt (79). Dann erfolgt die Chlorsubstitution der enolischen O-Acetylgruppe* mit Chlorwasserstoff in Eisessig-Essigsäureanhydrid. Für diese Reaktion mag folgender Mechanismus gelten:



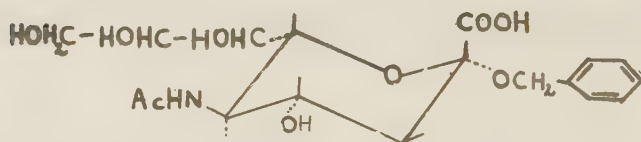
Die Bildung dieser intermediären Verbindung IV müssen wir postulieren, um die Entstehung des Endprodukts erklären zu können. (In der Literatur ist eine analoge Verbindung, nämlich das 3-Chlor 2-oxo-furan-dihydrid-(2,5.) beschrieben (80).)



* Das Vorliegen dieses enolischen Esters wurde nicht durch Analysen nachgewiesen sondern aufgrund vergleichbarer Darstellungsweise des Acetylderivats der Enolform des α -Keto- β -benzyl-buttersäure- γ -lactons angenommen.

Durch Behandlung des Chlorderivats mit Benzylalkohol, Silbercarbonat und Calciumsulfat bekommt man die die Benzylgruppe enthaltende Verbindung V (79), welche bei der nachfolgenden alkalischen Lactonringöffnung - wobei gleichzeitig die O-Acetyl-Gruppen verseift werden - das α -Benzyl-glykosid der N-Acyl-neuraminsäure gibt.

Der große Benzylrest strebt in die äquatoriale Position der $1C$ -Konformation.



Es werden im nachfolgenden Teil die experimentellen Details beschrieben, die zur Synthese von α -Benzyl-glykosiden der N-Acyl-neuraminsäure führen. Außerdem wird geprüft, ob die gewonnenen Verbindungen Substrate für die Neuraminidase darstellen.

III. EXPERIMENTELLER TEIL

=====

1. Darstellung des α -Benzyl-glykosids der N-Acetyl- und N-Glykolyl-D-neuraminsäure.

1. Ausgangsmaterial: 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Acyl-neuraminsäuren.

a.) 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton (Formel III' im theoretischen Teil, S. 29)

In Anlehnung an die Vorschriften von Kuhn und Bashang (76) und Faillard und Blohm (77) wird durch Kondensation des Kaliumsalzes des Oxalessigsäure-di-tert.-butylesters mit 4.6.-Benzyliden-N-acetyl-bzw. N-glykolyl-D-glucosamin das 3-tert.-Butyloxycarbonyl-7.9.-benzyliden-N-acetyl- bzw. N-glykolyl-neuraminsäure- γ -lacton erhalten. Nach Abhydrieren der Benzyliden-Gruppe gewinnt man das 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Acetyl-neuraminsäure als amorphes Pulver und das 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Glykolyl-neuraminsäure als eine weiße, kristalline Substanz. Die Kristalle sind nadelförmig und werden aus Propanol umkristallisiert. Smp.: 110-112°C

Charakterisierung der kristallisierten Substanz als 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Glykolyl-D-neuraminsäure.

Elementaranalyse nach Trocknen im Hochvakuum über P₂O₅ bei Raumtemperatur:

C ₁₆ H ₂₅ O ₁₁ N	Ber.: C 47,30	H 6,14	N 3,44
(407,36)	Gef.: 47,21	6,42	3,23

Spezifische Drehung:

$$[\alpha]_{589}^{20} = + 0,0309 \quad [\alpha]_{20}^{20} = + 10,6^{\circ} \quad (c = 2,91 \text{ in Wasser, Schichtdicke } 0,1 \text{ dm})$$

Die Substanz reduziert Silbernitrat nicht.

Dünnschichtchromatographische Analyse auf Cellulose:

(Cellulose Macherey und Nagel MN 300; Anfärbung mit Bial's Reagenz 1 : 1 verd. mit Wasser; Entwicklung im Trockenschrank bei 100°C während 20 Minuten. Im Verlauf dieser Arbeit benutzten wir, sofern nicht besonders hingewiesen wird, immer als Trägermaterial Cellulosepulver MN 300 und als Sprühreagenz zur Entwicklung der Platten das Bial-Reagenz, bestehend aus 20 mg Orcin, 8,2 ml konz. HCl und 0,2 ml 1 % FeCl₃-Lösung in 10 ml Wasser.)

Fließmittel: Butanol/Propanol/Wasser 1 : 2 : 1; einheitlicher Fleck; R_F-Wert 0,83.

Fließmittel: Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3; R_F-Wert 0,66.

Das entsprechende N-Acetyl-neuraminsäure-γ-lacton unterscheidet sich in beiden Fließmitteln nicht von den R_F-Werten des kristallisierten 3-tert.-Butyloxycarbonyl-γ-lactons der N-Glykolyl-neuraminsäure.

IR-Spektrum:

Alle in dieser Arbeit gezeigten Infrarotspektren wurden als Kaliumbromid-Presslinge (ca. 1 mg Substanz auf 300 mg KBr) im Perkin Elmer 337 Grating Spectrophotometer aufgenommen (vergl. Abb. auf der nächsten Seite).

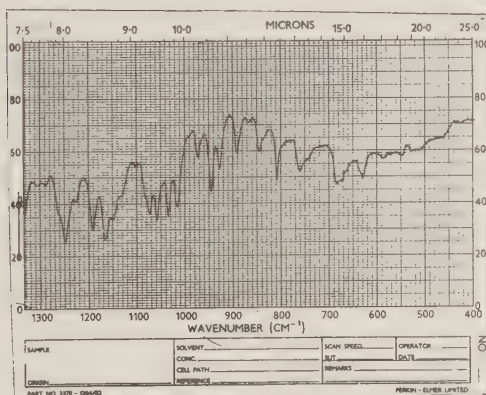
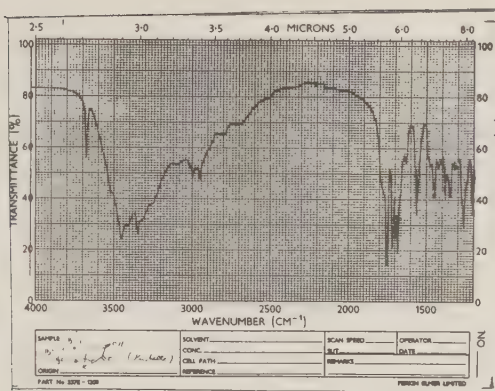


Abb. 1. IR-Spektrum 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Glykolyl-neuraminsäure in KBr gepresst.

b.) γ -Lacton der N-Acetyl- bzw. N-Glykolyl-neuraminsäure
(Formel II im theoretischen Teil, S. 29)

Durch Erhitzen in wässriger Lösung bei 90-100° C, 15 Minuten lang, zerfällt das 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Acyl-neuraminsäuren III' unter Abspaltung von Isobutylen und CO₂ zu den entsprechenden γ -Lactonen der N-Acyl-neuraminsäuren. Aus 2 g kristallisiertem 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Glykolyl-neuraminsäure

erhält man 1,4 g γ -Lacton. Ausb.: 94 % d. Th. Diese Substanzen werden als gefriergetrocknete, amorphe Pulver erhalten und weiterverarbeitet. Kristallisationsversuche aus Propanol waren ohne Erfolg.

Dünnschichtchromatographische Analyse auf Cellulose:

Fließmittel: Butanol/Propanol/Wasser 1 : 2 : 1; R_F -Wert 0,55 für N-Glykoly- und 0,59 für N-Acetyl-neuraminsäure- γ -lacton. Mit dem Fließmittel Essigester/Eisessig/Wasser 9 : 2 : 2 und nach Anfärbung mit Perjodat/Benzidin-Reagenz (35) sind auf der Dünnschichtplatte 4 Flecke zu erkennen, wovon nur der als Hauptprodukt auftretende am schnellsten wandernde Fleck auch Bial positiv ist.

Papierchromatographie:

(Schleicher und Schüll 2043 b, Fließmittel: Essigester/Eisessig/Wasser 9 : 2 : 2; Laufzeit 5 1/2 Stunden, absteigend; Einsprühen Perjodat/Benzidin-Reagenz (36)):

Man kann für das γ -Lacton der N-Acyl-neuraminsäure auf dem hell-blau gewordenen Papier wiederum 4 Flecken erkennen. Beim Anfärben mit Hydroxamsäure/ Fe^{3+} (37) (als spezifisches Reagenz für Lactone) erschienen die gleichen vier epimeren Formen des Lactons. Auch hier ist nur der am schnellsten wandernde Fleck Bial positiv.

In einem Versuch zur Trennung der vier verschiedenen Fraktionen wird eine Cellulose-Säule (MW 2100ff) und das Fließmittel Essigester/Eisessig/Wasser 9 : 2 : 2 benutzt. Durch fraktioniertes Auffangen des Eluates und nach Abdampfen der Lösungsmittel am Rotationsverdampfer unter mehrmaliger Zugabe von Wasser werden die verschiedenen Fraktionen getrennt und chromatographiert. Dabei zeigte sich, daß keine der vier Substanzen rein isoliert werden kann.

Nach 24-stündigem Stehenlassen im Kühlschrank mit 2n NaOH ist als Hauptprodukt chromatographisch N-Acetyl-neuraminsäure nachzuweisen. Die nachfolgenden Umsetzungen werden mit dem Gemisch dieser epimeren Lactone durchgeführt.

c.) 2.6.7.8.9.-Penta-O-acetyl-5-N-acetyl- bzw. N-(glykolyloxy-O-acetyl)-neuraminsäure- γ -lacton (Formel III im theoretischen Teil, S. 30)

In Anlehnung an die Vorschrift von Dale (88) werden die oben gewonnenen, amorphen γ -Lactone der Neuraminsäure acetyliert. Zu 1 g Substanz gibt man langsam ein Gemisch aus 3 ml Pyridin (über KOH destilliert) und 10 ml Essigsäureanhydrid (frisch dest.) unter Eiskühlung und kräftigem Rühren. Nach kurzer Zeit ist alles gelöst. Nach 18-24-stündigem Stehenlassen bei 0° C fügt man die dunkel gewordene Lösung zu 100 g Flockeneis hinzu und rührt eine Stunde lang. Anschließend wird die Lösung zur Entfernung des Pyridins über eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50x4, 20-50 mesh, H⁺-Form) gegeben; die Säule wird mit Wasser gewaschen.

Um das Lacton als definierte Ausgangssubstanz in Form des Epimeren-Gemisches einsetzen zu können, müssen Beimengungen kleinster Mengen Per-O-Acetyl-neuraminsäure, deren Entstehung durch Öffnen des Lacton-Ringes nicht auszuschließen ist, über eine Anionenaustauschersäule (Dowex 1x4, 20-40 mesh, HCO₂⁻-Form) entfernt werden. Das Lacton enthaltende wässrige Eluat wird im Vakuum eingeeengt und gefriergetrocknet. Man erhält 1,1 g (70 % d. Th.) der hell-gelben, amorphen Produkte, die nach zusätzlicher Trocknung im Vakuum über CaCl₂ bei Raumtemperatur, wie unten beschrieben, weiter verarbeitet werden.

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H:

Fließmittel: Butanol/Propanol/Wasser 1 : 2 : 1 :

Die acetylierten Derivate der beiden Neuraminsäure-lactone zeigen den gleichen R_F -Wert: 0,45. Sie werden von geringer Menge einer zweiten Substanz, die etwas langsamer wandert, begleitet (R_F = 0,38-0,39).

d.) 2-Chlor-2-deoxy-6.7.8.9.-tetra-O-acetyl-N-acetyl- bzw. N-(glykoly-O-acetyl)-neuraminsäure- γ -lacton (Formel IV, S. 30)

Je 1 g peracetyliertes Derivat der γ -Lactone der N-Acyl-neuraminsäuren wird in 50 ml Eisessig und 25 ml Essigsäureanhydrid gelöst und auf 0° C gekühlt. In diese Lösung leitet man trockenes HCl-Gas bis zur Sättigung ein und läßt anschließend bei 0° C noch 14 Stunden stehen. Dann werden HCl-Gas und die Lösungsmittel weitgehend durch Einengen im Vakuum bei mehrmaliger Zugabe von Eisessig entfernt, und man unterwirft die essigsäure Lösung der Gefriertrocknung. Ausb.: 1,4 g. Die gelb gefärbte, amorphe Substanz wird sofort nach der Gefriertrocknung weiterverarbeitet.

e.) N-Acetyl- bzw. N-glykoly-neuraminsäure- α -benzylglykosid (Formel VI, S. 30)

1,4 g 2-Chlor-tetra-O-acetyl-N-acetyl- bzw. N-(glykoly-O-acetyl)- γ -lacton werden in 60 ml Benzylalkohol unter Zugabe von 1,5 g "aktivem" Silbercarbonat* und 1 g wasserfreiem Calciumsulfat (im Trockenschrank bei 190° C 24 Stunden getrocknet) während 20 Stunden bei Raumtemperatur und

Lichtausschluß geschüttelt.

* Das in die Synthese eingesetzte "aktive" Silbercarbonat konnte folgender Weise dargestellt werden: Eine Lösung von 8 g NaCO_3 in 38 ml Wasser wird langsam und unter Rühren einer Lösung von 40 g AgNO_3 in 100 ml Wasser zugetropft. Zu dem erhaltenen Niederschlag gibt man eine Lösung von 5 g NaHCO_3 in 62 ml Wasser. Anschließend wird das frisch gefällte Silbercarbonat abzentrifugiert und nach mehrmaligem Auswaschen mit Wasser über CaCl_2 im Exsikkator im Vakuum getrocknet.

Nach Abfiltrieren des Silbercarbonates, Silberchlorides und Calciumsulfates wird die benzyl-alkoholische Lösung im Hochvakuum bei $50-60^\circ \text{C}$ bis zum Sirup eingeengt, den man in 70 ml Aceton/Wasser, 1 : 1 aufnimmt. Nach Zugabe von 10 ml 1n NaOH und 30 Minuten Stehenlassen bei Raumtemperatur wird nach Zufügen weiterer 10 ml 1n NaOH (pH 11) 15 Minuten auf 50°C erwärmt. Anschließend filtriert man das ausgefallene Silberoxyd ab und läßt die alkoholische Lösung zur Vervollständigung der Verseifung und Lactonring-Öffnung 24 Stunden im Kühlraum stehen. Unter Zugabe von Wasser dampft man hinterher das Aceton im Vakuum ab und entfernt den restlichen Benzylalkohol durch Ausschütteln der wässrigen Lösung mit Äther. Die gelb gefärbte wässrige Lösung gibt man zur Entsalzung über eine Kationenaustauschersäule aus Dowex 50x4 (20-50 mesh, H^+ -Form), und das erhaltene saure Eluat unterwirft man einer Gefriertrocknung. Ausb.: 400 mg. Das amorphe, hygroskopische und gelb-braun gefärbte Produkt wird wie anschließend beschrieben chromatographiert.

Dünnschichtchromatogramme auf Cellulose:

Fließmittel: Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3:

α -Benzyl-glykosid der N-Acetyl-neuraminsäure; R_F -Wert 0,46 bzw. der N-Glykoly-l-neuraminsäure; R_F = 0,47.

Bei Benutzung von $[1-^{14}\text{C}]$ Benzylalkohol (0,05 mC zu oben

genanntem Ansatz) zeigt das Chromatogramm im Radioautogramm (168 Stdn. auf Adox Röntgen-Folien-Film) nur an diesen Stellen ($R_F = 0,46$ und $0,47$) Schwärzungen, was zur weiteren Identifizierung der Benzylglykoside innerhalb der Produkte des Reaktionsgemisches beitrug.

Auf dem Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsprodukts, angefärbt mit Bial's Reagenz, fanden sich außer der am Startpunkt liegenbleibenden Neuraminsäure noch 3 weitere schwache Flecke (R_F -Werte von $0,59$, $0,77$, $0,97$), die durch anschließende Säulenchromatographie von der Hauptkomponente getrennt werden konnten.



Abb. 2: Dünnschichtchromatogramm: Cellulose MN 300; Fließmittel: Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3; Anfärbung: Bial's Reagenz. Reaktionsgemisch vor säulenchromatographischer Trennung zur Isolierung des reinen α -Benzylglykosids der N-Acetyl-neuraminsäure.

f.) Säulenchromatographische Trennung zur Isolierung des α -Benzylglykosids aus dem Reaktionsgemisch:

400 mg des Glykosidgemisches werden an einer Cellulose-Säule (Cellulose MN 2100ff) unter Benutzung von Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3 chromatographisch getrennt. Das Eluat wird in einem Fraktionssammler aufgenommen. Man erhält die verschiedenen Fraktionen gut voneinander getrennt (Abb. 3), wobei das Hauptprodukt in chromatographisch einheitlicher Form isoliert werden konnte (Fr. 69-72). Zur schonenden Rückgewinnung der Substanz aus dem Eluat wird der Essigester im Vakuum abgedampft und das Pyridin durch Filtration über eine Kationenaustauschersäule (Dowex 50x4, H^+ -Form) entfernt. Nach Einengen des Eluates am Rotationsverdampfer unterwirft man es der Gefriertrocknung. Ausb.: 60 mg. Die Substanz konnte nicht kristallin, sondern nur als ein amorphes, farbloses, stark hygroskopisches Produkt erhalten werden.

Zur Charakterisierung wird das Ketosid acetyliert.



Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm: Cellulose MN 300; Fließmittel: Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3; Färbung: Bial's Reagenz. Ergebnis der chromatographischen Trennung des α -Benzylglykosids der N-Acetylneuraminsäure. Frakt. 69-72 reines α -Benzylglykosid der N-Acetylneuraminsäure.

g.) 4.7.3.9.-Tetra-O-acetyl-N-acetyl- bzw. N-(glykoly-O-acetyl)-neuraminsäure- α -benzyl-glykosid.

40 mg des durch Chromatographie an Cellulose einheitlich erhaltenen α -Benzyl-glykosids der N-Acetyl-neuraminsäure werden mit 0,12 ml Essigsäureanhydrid in Gegenwart von 0,1 ml Pyridin unter Rühren und Eiskühlung versetzt. Man läßt die Lösung während 2 Tagen bei +2° C stehen. Der Ansatz wird dann in Eiswasser gegossen und eine Stunde gerührt. Nach Einengen im Vakuum bei 30° C unter mehrmaliger Zugabe von Wasser entfernt man das restliche Pyridin über einen Kationenaustauscher (Dowex 50x4, H⁺-Form). Beim Abdampfen des Eluates im Vakuum fällt eine amorphe Substanz aus. Nachdem das Eluat bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingeengt worden war, löst man den Rückstand in etwas Aceton auf und läßt die Lösung nach Zugabe von Wasser zur Kristallisation im Eisschrank stehen. Schon nach einigen Stunden bilden sich Kristalle, die später abfiltriert und mit kaltem Wasser gewaschen werden. Ausb.: 50 mg nadelförmige bis lang prismatische, weiße Kristalle, doppelbrechend in polarisiertem Licht, leicht löslich in Aceton und Äther, schwer löslich in Wasser.

Schmp.: 192-195° C (Zersetzung)

Das Per-O-Acetyl-N-glykoly-neuraminsäure-Derivat kann auf analoge Weise wie oben beschrieben, nach Abdampfen des wässrigen Eluates, aus Aceton/Wasser kristallin gewonnen werden. Die während des Einengens am Rotationsverdampfer amorph anfallende Substanz ist in Äther löslich und kann so auch aus der wässrigen Lösung extrahiert werden. Nach Einengen der Ätherphase im Vakuum und Sättigung mit Wasser kristallisiert das Produkt aus. Die Kristalle sind weiß, haben Rosettenform

mit lang prismatischen bis nadelförmigen Zacken (Abb. 4), doppelbrechend im polarisierten Licht, leicht löslich in Aceton und Äther, unlöslich in Wasser.

Schmp.: 187-190° C (Zersetzung)



Abb.4: Kristalle vom Per-O-Acetyl- α -benzyl-glykosid der N-Glykoly-D-neuraminsäure. (60-fache Vergrößerung)

Dünnschichtchromatographische Analyse auf Kieselgel H:

Fließmittel: Butanol/Propanol/Wasser 1 : 2 : 1:

Per-O-Acetyl-N-acetyl-neuraminsäure- α -benzyl-glykosid,

$R_F = 0,53$; Per-O-Acetyl-N-(glykoly-O-acetyl)-neuraminsäure- α -benzyl-glykosid, $R_F = 0,64$.

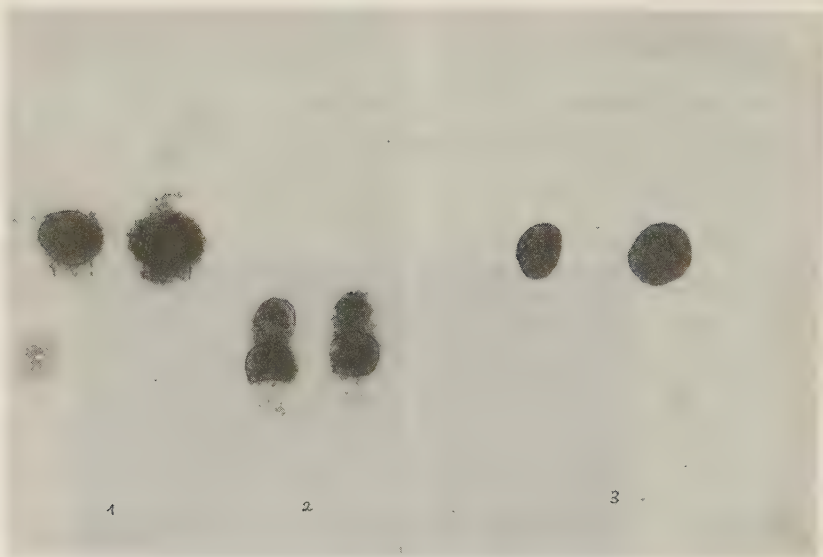


Abb. 4-5: Dünnschichtchromatogramme auf Kieselgel H:
 Fließmittel: Butanol/Propanol/Wasser 1 : 2 : 1;
 Anfärben: Bial's Reagenz.
 1. Per-O-Acetyl- α -benzyl-glykosid der N-Acetyl-
 neuraminsäure
 2. Per-O-Acetyl-N-acetyl-neuraminsäure
 3. Per-O-Acetyl- α -benzyl-glykosid der N-(Glykoly-
 l-O-acetyl)-neuraminsäure

Elementaranalysen:

Die Substanzen werden vorher bei Raumtemperatur im Hoch-
 vakuum über P_2O_5 getrocknet:

a.) α -Benzyl-glykosid der 4.7.3.9.-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-
 D-neuraminsäure

$C_{26}H_{33}O_{13}N$	Ber.: C 55,03	H 5,86	N 2,47
(567,53)	Gef.: 55,19	5,71	2,52

b.) α -Benzyl-glykosid der 4.7.3.9.-Tetra-O-acetyl-N-(gly-
 koly-O-acetyl)-D-neuraminsäure

$C_{28}H_{35}O_{15}N$	Ber.: C 53,76	H 5,64	N 2,24
(625,57)	Gef.: 53,41	5,80	2,13

IR-Spektren:

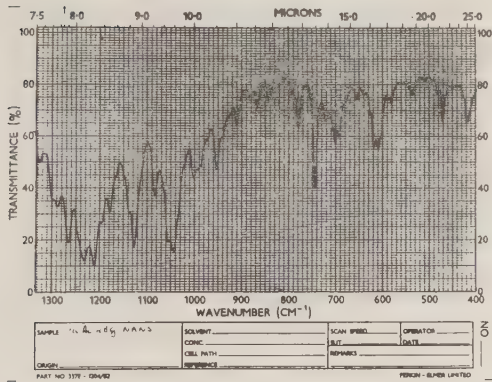
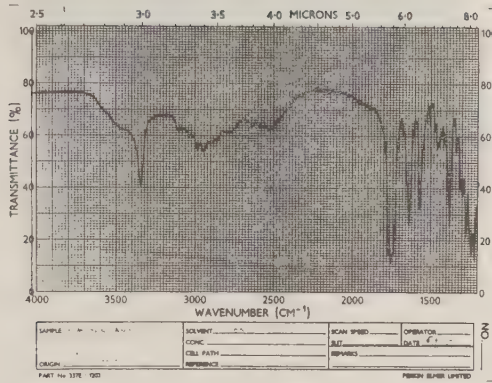


Abb. 6: IR-Spektrum
 α -Benzyl-glykosid der 4.7.3.9.-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-D-neuraminsäure in KBr gepresst.

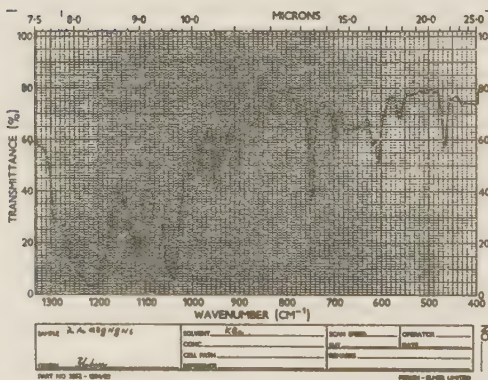
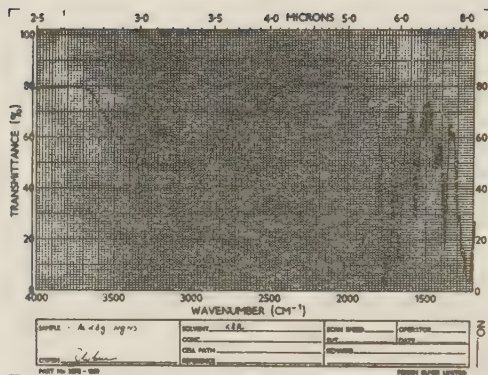


Abb. 7: IR-Spektrum

α -Benzyl-glykosid der 4.7.3.9.-Tetra-O-acetyl-N-(glykoly-0-acetyl)-D-neuraminsäure in KBr gepresst.

2. Ausgangsmaterial: Kristallisierte, synthetisch dargestellte N-Glykolyyl-D-neuraminsäure.

Die eingesetzte N-Glykolyyl-neuraminsäure wird nach Faillard und Blohm (77) durch Kondensation des Kaliumsalzes des Oxal-essigsäure-di-tert.-butylesters mit dem 4.6.-Benzyliiden-Derivat des N-Glykolyyl-glucosamins synthetisiert, wobei letzteres durch Glykolierung von Glucosamin-hydrochlorid mittels 1.3.-Dioxolan-2.4.-dion gewonnen wird.

a.) 2.4.7.8.9.-Penta-O-acetyl-N-(glykolyyl-O-acetyl)-neuraminsäure (Formel im theoretischen Teil, S. 25)

100 mg N-Glykolyyl-neuraminsäure werden mit 1,3 ml Pyridin (über BaO destilliert) und 1,6 ml frisch dest. Acetanhydrid unter Eiskühlung und Rühren versetzt. Nach 60 Stunden ist die Neuraminsäure vollständig gelöst und die Peracetylierung beendet. Der Ansatz wird zur Zersetzung des überschüssigen Essigsäureanhydrids in Eiswasser eingegossen und eine Stunde gerührt. Nach Einengen im Vakuum bei 30° C unter mehrfach wiederholter Zugabe von Wasser wird das restliche Pyridin über eine Kationenaustauschersäule entfernt. Nach Gefriertrocknung erhält man 150 mg (90 % d. Th.) einer amorphen, chromatographisch weitgehend einheitlichen, farblosen Substanz.

Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel H:

Fließmittel: Butanol/Propanol/Wasser 1 : 2 : 1; R_F -Wert 0,24.

Die Peracetyl-Verbindung der N-Glykolyyl-neuraminsäure wird von geringen Mengen zweier Substanzen, von denen eine im Chromatogramm schneller, die andere etwas langsamer wandert, begleitet.

b.) 4.7.3.9.-Tetra-O-acetyl-N-(glykolyl-O-acetyl)-2-chlor-2-desoxy-neuraminsäure (Formel III, S. 25)

100 mg 2.4.7.3.9.-Penta-O-acetyl-N-(glykolyl-O-acetyl)-neuraminsäure werden in 5 ml Eisessig und 2,5 ml Essigsäureanhydrid gelöst und wie bei 1 d.) S. 33 beschrieben, durch Einwirkung von HCl-Gas in der Kälte chloriert. Die aus Eisessig gefriergetrocknete Substanz ist hygroskopisch und zersetzt sich schnell.

c.) N-Glykolyl-neuraminsäure- α -benzyl-glykosid

Die oben erhaltene Acetochlor-N-glykolyl-neuraminsäure wird wie bei 1 e.) S. 33 mit 5 ml Benzylalkohol, 130 mg frisch gefälltem Silbercarbonat und 100 mg trockenem Calciumsulfat versetzt und weiterverarbeitet. Die Verseifung der O-acetyl-Gruppen erfolgt durch Zugabe von 1 ml 1n NaOH, Stehenlassen bei Raumtemperatur während 45 Minuten und Erwärmen im Wasserbad bei 50° C während 15 Minuten. Kolloidale Silbersalze, die dabei ausflocken, färben die Lösung dunkel. Sie werden abfiltriert. Den überschüssigen Benzylalkohol entfernt man durch mehrmaliges Ausschütteln der Lösung mit Äther und die Kationen durch Filtration über eine Kationenaustauschersäule Dowex 50 x 4. Das saure Eluat wird gefriergetrocknet. Ausb.: 50 mg einer hell-gelben, amorphen und leicht hygroskopischen Substanz.

Dünnschichtchromatographie auf Cellulose:

Im Fließmittel Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3 zeigt das Hauptprodukt, das α -Benzyl-glykosid der N-Glykolyl-neuraminsäure, einen R_F -Wert von 0,47. Außer von der an der Startlinie liegenbleibenden, nicht umgesetzten N-Glykolyl-neuraminsäure wird das Produkt von kleinen Mengen zweier

nicht weiter identifizierter Substanz begleitet.

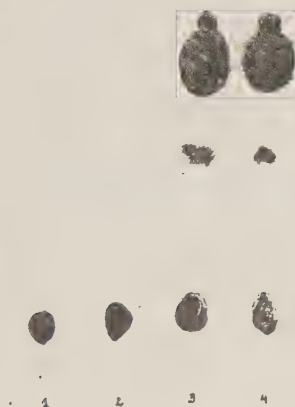


Abb. 3: Dünnschichtchromatogramm: Fließmittel: Essigester/
Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3; Anfärben: Bial's Reagenz.
1-2: N-Glykolyyl-neuraminsäure.
3-4: Reaktionsgemisch vor Säulenchromatographie zur
Isolierung des reinen α -Benzyl-glykosids der N-Gly-
kolyyl-neuraminsäure.

1.) Säulenchromatographische Trennung zur Reindarstellung des
 α -Benzyl-glykosids der N-Glykolyyl-neuraminsäure aus dem er-
haltenen Reaktionsgemisch:

Das Reaktionsgemisch wird über eine Cellulose-Säule (Cellu-
lose MN 2100ff) 45 x 3,3 cm unter Benutzung von Essigester/
Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3 als Elutionsmittel chromatogra-
phisch getrennt. Das Eluat wird in Fraktionen von je 10 ml
aufgenommen. Von Fr. 36 (s. Abb. 9) an erscheint das α -Ben-
zyl-glykosid zunächst noch mit Beimengungen der etwas schnel-

ler wandernden Substanz. In den Fr. 42-51 konnte es aber rein erhalten werden. Die Reagenzgläser ab Fr. 53 enthalten praktisch nur das langsamer wandernde, nicht weiter identifizierte Nebenprodukt. Ab Fr. 60 erscheint die in der Reaktion nicht umgesetzte N-Glykoly-l-neuraminsäure. Nach Entfernung des Fließmittels durch Einengen am Rotationsverdampfer unter Wasser-Zugabe und Filtrieren über eine Kationenaustauschersäule Dowex 50 (20x50 mesh, H⁺-Form) erhält man nach Gefriertrocknung des Eluates 20 mg chromatographisch einheitliches α -Benzyl-glykosid der N-Glykoly-l-neuraminsäure.



Abb. 9: Dünnschichtchromatogramm: Fließmittel: Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3; Anfärben: Bial's Reagenz. Ergebnis der säulenchromatographischen Fraktionierung zur Reindarstellung des α -Benzyl-glykosids der N-Glykoly-l-neuraminsäure.

Die gefriergetrocknete, feillose, hygroskopische Substanz

beschrieben peracetyliert.

Die so gewonnene Substanz erwies sich aufgrund ihres chromatographischen Verhaltens und der Analysenwerte als völlig

identisch mit der direkt aus dem Lacton (S. 43) erhaltenen Verbindung.

.) Synthese des β -Benzyl-glykosids der N-Glykolylnuraminsäure

In Analogie zu dem Verfahren von Faillard, Kirchner und Blohm (70) zur Synthese des β -Anomers der N-Acetyl-nuraminsäure werden 50 mg 2.4.7.3.9.-Penta-O-Acetyl-N-(glykolylo-Acetyl)-nuraminsäure mit 0,5 ml $[1-^{14}\text{C}]$ Benzylalkohol und einer Spatelspitze ZnCl_2 unter Feuchtigkeitsabschluß und Rühren während 25 Minuten auf $130-150^\circ \text{C}$ erhitzt. Anschließend wird das dunkel gefärbte Reaktionsgemisch mit methanolischem Ammoniak versetzt und 48 Stunden im Eisschrank stehen gelassen, wobei eine weitgehende Verseifung des bei der Reaktion gleichzeitig entstandenen Esters eintritt. Die anfallenden, ungelösten Zersetzungsprodukte werden abfiltriert, das Methanol abgedampft und der Rückstand in Wasser aufgenommen. Durch Ausschütteln mit Äther entfernt man den Benzylalkohol und aus der wässrigen Phase die Chlorid-Ionen durch Fällung mit Silberacetat. Anschließend wird die Lösung zur Entfernung der Kationen über eine Säule aus Dowex 50x4 (H^+ -Form) filtriert.

Im Dünnschichtchromatogramm auf Cellulose (Macherey und Nagel MN 300), Fließmittel Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3 zeigen sich nach Anfärben mit Bial's Reagenz neben der am Startpunkt liegenbleibenden N-Glykolylnuraminsäure 3 Flecken, die gleichfalls im Radioautogramm (Adox Röntgen-Folienfilm) zu erkennen sind. R_F -Werte 0,31 (β -Benzylglykosid der N-Glykolylnuraminsäure), 0,43 (α -Benzylglykosid der N-Glykolylnuraminsäure) und 0,52 (entspricht

einer nicht identifizierten Substanz).

Nach präparativ papierchromatographischer Trennung dieser Fraktionen (Schleicher und Schüll 2043, Fließmittel: Essig-ester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3, aufsteigend) und Anfärben von drei schmalen, abgeschnittenen Papierstreifen (Anfang, Mitte und Ende des papierchromatographischen Bogens) mit Bial's Reagenz zur Identifizierung der Lage der Substanzen, werden die substanzenthaltenden Teile des Papierbogens getrennt mit Wasser eluiert. Nach Einengen der wässrigen Eluate entnimmt man aliquote Teile, die einer Neuraminidase-Einwirkung (wie unten näher beschrieben wird) unterworfen werden. Nur das Produkt - identisch mit dem nach der Koenigs-Knorr-Reaktion erhaltenen α -Benzyl-glykosid - mit dem R_F -Wert von 0,43 bzw. 0,47 konnte enzymatisch zu N-Glykolylnuraminsäure gespalten werden. Im Vergleich zu dem β -Benzyl-glykosid der N-Acetyl-nuraminsäure (R_F = 0,23) wandert das β -Benzyl-glykosid der N-Glykolylnuraminsäure mit einem R_F -Wert von 0,31.

B. Biologische und chemische Eigenschaften der synthetisch erhaltenen α -Benzyl-glykoside der N-Acyl-nuraminsäure.

1. Enzymatische Spaltung mit Neuraminidasen aus *Clostridium perfringens* und *Vibrio cholerae*.

a.) Spaltung mit Neuraminidase aus *Clostridium perfringens*:

Die hier angewandte Neuraminidase wurde von r. Segschneider (81) aus dem Kulturfiltrat von *Clostridium perfringens* isoliert, angereichert und durch fraktionierte Fällung mit

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Säulenchromatographie über Sephadex G-200 gereinigt. Da die hoch gereinigte Neuraminidase in konz. Lösung sehr empfindlich ist (39), wird zur Stabilisierung ihrer Aktivität reines Rinderserumalbumin (RSA) zugegeben, das die Neuraminidase durch die Bildung eines Komplexes schützt. Die spezifische Aktivität des eingesetzten Neuraminidase-RSA-Präparats beträgt 11 640 E/mg Protein (eine Enzymeinheit wird definiert als die Enzymmenge, die vom natürlichen Substrat* in 0,1 M Kalium-acetat-Pufferlösung, pH 4,9, in 15 Minuten bei 37° C 1 µg N-Acetyl-neuraminsäure abspaltet).

* Als Substrat diente im vorliegenden Falle Gangliosid aus Menschengehirn mit 11,7 % N-Acetyl-neuraminsäure (nach Bial bestimmt); im Kontrollversuch war nach 24 Stunden mit 44 E/ml 59,8 % der N-Acetyl-neuraminsäure enzymatisch abspaltbar.

2,5 mg α -Benzyl-glykosid der N-Acetyl- bzw. N-Glykolylnuraminsäure werden in 0,5 ml Kalium-acetat-Puffer (pH 4,9) gelöst. Aus dieser Lösung werden zwei Proben von je 0,2 ml entnommen; zu der einen gibt man 0,25 ml einer Enzymlösung (*Clostridium perfringens* 10 000 E/ml) und zu der anderen 0,25 ml Wasser als Kontrollansatz.

Beide Ansätze läßt man während 36 Stunden bei 37° C stehen. Nach Dialyse, Entsalzung und Einengen des Dialysates im Vakuum wird der eingeeengte, salzfreie Rückstand des Dialysates chromatographiert.

Im Dünnschichtchromatogramm auf Cellulose zeigt sich im Fließmittel Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3 in der Kontrolle ohne Enzym nur ein dem α -Benzyl-glykosid entsprechender Fleck, während in den anderen Ansätzen eine neue Substanz mit dem R_F -Wert der N-Acetyl- bzw. N-Glykolylnuraminsäure auftritt. Geringe Mengen von nicht ge-

spaltenem Substrat sind auf dem Chromatogramm außerdem noch zu erkennen, woraus man schließen kann, daß dieses

α -Glykosid in der angegebenen Zeit nicht vollständig durch Neuraminidase gespalten wird.

Neben diesem chromatographischen, qualitativen Versuch bestimmten wir quantitativ die Mengen N-Acetyl-neuraminsäure, die durch Einwirkung der Neuraminidase aus Clostridium perfringens (81) vom α -Benzyl-glykosid abgespalten werden kann. Die freigesetzte N-Acetyl-neuraminsäure (theoretischer Teil S. 24) wird mit der Thiobarbitursäure-Methode nach Aminoff (70) bestimmt.

Beschreibung der Aminoff-Methode:

Zu 0,5 ml Lösung (enthaltend 0,25 ml Substratlösung und 0,25 ml Enzymlösung) werden 0,25 ml Perjodatreagenz (25 mmol Perjodsäure in 0,125n H_2SO_4 , pH 1,2) zugegeben und während 30 Minuten im Wasserbad auf 37° C erwärmt. Der Perjodatüberschuß wird mit einer Arsenitlösung (2,5%ige Lösung Na_3AsO_3 in 0,5n HCl) reduziert. Nachdem die gelbe Farbe verschwunden ist (1-2 Min.), werden 2 ml Thiobarbitursäure (0,1m Thiobarbitursäure, in Wasser gelöst und mit NaOH auf pH 9 gebracht) zugegeben und 7,5 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach einigen Minuten erscheint eine rote Farbe, die beim Abkühlen in Eiswasser heller wird. Nach Ausschütteln mit 5 ml n-Butanol/5 % 12n HCl (v/v) und kurzem Zentrifugieren wird gegen einen Leerwert (enthaltend 0,25 ml Substratlösung und 0,25 ml Pufferlösung, genauso behandelt wie oben beschrieben) bei 546 m μ am Photometer abgelesen.

Mit folgenden Lösungen wird gearbeitet:

Substratlösung: 0,25 ml 0,2m Kalium-Acetat-Puffer (pH 4,9),
enthaltend 95 μ g glykosidisch gebundene N-Acetyl-neuramin-

säure, entsprechend 122,5 µg N-Acetyl-neuraminsäure- α -benzyl-glykosid. (Da sich die äußerst hygroskopische Substanz nicht genau genug einwiegen läßt, wird nach ungefährrer Einwaage der exakte Gehalt der Lösung mittels der Bial'schen Orcinol-Methode colorimetrisch als N-Acetyl-neuraminsäure bestimmt und auf das Benzyl-glykosid umgerechnet.)

Enzymlösung: 0,25 ml 0,001m Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,0), enthaltend 92 Enzymeinheiten. (S. 53)

Zur Auswertung dieser Methode wird zuerst eine Eichkurve mit synthetischer N-Acetyl-neuraminsäure aufgestellt. Die Kurve - Extinction als Funktion der Konzentration - zeigt bis zu einer Konzentration von 145 µg N-Acetyl-neuraminsäure (in 0,5 ml wässriger Lösung) einen geradlinigen Verlauf, woraus sich ein Faktor von 29 (Extinction x Faktor = Konzentration) ergibt, der dann bei den verschiedenen Bestimmungen als Umrechnungsfaktor von erhaltener Extinction zur Menge "freier" Neuraminsäure dient.

Zur Ermittlung der zeitabhängigen Freisetzung von N-Acetyl-neuraminsäure durch Einwirkung des Enzyms auf das Substrat α -Benzyl-glykosid der N-Acetyl-neuraminsäure wird folgendermaßen verfahren:

8 Proben von 0,25 ml Substratlösung + 0,25 ml Enzymlösung werden verschieden lange Zeit inkubiert (siehe nachfolgende Tabelle). Die Menge jeweils abgespaltener Neuraminsäure bestimmt man nach Aminoff, und die erhaltenen Extinctionen liest man gegen Vergleichslösungen von 0,25 ml Substratlösung + 0,25 ml 0,001m Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,0) ab. Dieser "Leerwert" gibt unter den Bedingungen der Methode, unabhängig von der Inkubationszeit, abgelesen gegen n-Butanol/5 % 12n HCl, schon eine Extinction von 0,550, was

einer Menge an freier N-Acetyl-neuraminsäure von 15,95 ug bzw. 16,3 % entspricht. Dadurch können selbst bei 100 %iger enzymatischer Spaltung des Substrates nur 79,05 ug bzw. 33,2 % glykosidisch gebundener N-Acetyl-neuraminsäure erfaßt werden. Dies zeigt, daß die Glykoside mit Aglyconen labiler sind, als die in der Natur vorkommenden Glykoproteine. Die Ergebnisse der enzymatischen Spaltung in Abhängigkeit der Zeit sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Minuten inkubat.	Extinct. 546 mμ*	ug N-AcNS enzymat.ab- gespaltet	% abgesp. N-AcNS **
1	0,083	2,41	3,05
5	0,322	9,35	11,83
10	0,399	11,57	14,62
15	0,417	12,10	15,30
20	0,491	14,23	18,00
30	0,481	13,95	17,65
60	0,527	15,29	19,33
180	0,614	17,80	22,50

* bestimmt nach Aminoff

** bezogen auf eine Menge von 79,05 ug, die unter Berücksichtigung des oben angeführten "Leerwertes" 100 % enzymatisch spaltbarer N-Acetyl-neuraminsäure entsprechen.

Aus dieser Tabelle können wir die hohe Anfangsgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ansehen. Nach 5 Minuten sind schon annähernd 50 % der in 3 Stunden abspaltbaren Menge N-Acetyl-neuraminsäure vom Glykosid enzymatisch gelöst worden.

Die Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration gehorcht der Michaelis-Mentenschen Ki-

netik.

Nach der graphischen Methode von Lineweaver und Burk (90), der die Gleichung (1) zugrunde liegt, werden die Werte der Substratkonzentration $[S]$ (Mol/l α -Benzyl-glykosid), gegen den Quotient $\frac{[S]}{v}$ aufgetragen, wobei v die Reaktionsgeschwindigkeit ist (Ausgedrückt in Mol/l "freier" N-Acetyl-neuraminsäure, die nach 15-minütiger enzymatischer Spaltung nach Amionoff bestimmt wird).

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}} \cdot [S] \quad (1)$$

Man erhält erwartungsgemäß eine Gerade der Steigung $\frac{1}{v_{max}}$, deren Schnittpunkte mit der Ordinate $\frac{K_m}{v_{max}}$ und mit der Abszisse $-K_m$ sind.

In der folgenden Tabelle findet man zusammenfassend die erhaltenen Ergebnisse aus den durchgeführten Versuchen, notwendig zur Aufstellung der Kurve nach Gleichung (1):

Bestimmung N ^o	[S] uMol/l N-AcNS- - Benz.-glyk.	v uMol/l freie N- AcNS	$\frac{[S]}{v}$	$\frac{[S]}{v}$ nach Regres- sionsrechnung
1	114,2	25,2	4,53	4,70°
2	228,5	42,3	5,40	4,97
3	457,0	83,5	5,47	5,51
4	731,0	119,5	6,14	6,16
5	914,0	147,2	6,21	6,59
6	1460,0	196,3	7,83	7,83
7	1826,0	204,1	8,93	8,75

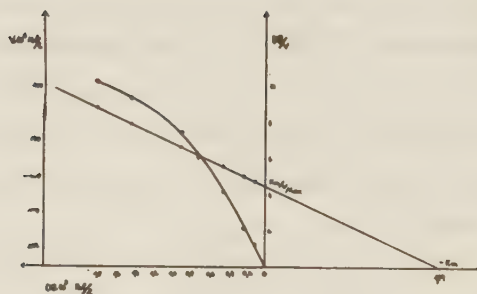


Abb. 10: Spaltung des α -Benzyl-glykosids der N-Acetylneuraminsäure durch *Clostridium perfringens*-Neuraminidase als Funktion der Substratkonzentration. [S] uMol/l α -Benzyl-glykosid der N-Acetylneuraminsäure; v uMol/l enzymatisch freigesetzte N-Acetylneuraminsäure; Km Michaelis-Konstante.

$$o \dots v = f([S]) \quad . \dots \frac{[S]}{v} = f([S])$$

Aus der Geraden ergibt sich im Schnittpunkt mit der Abszisse eine Michaelis-Konstante K_m von $1,9 \cdot 10^{-3}$ Mol/l

b.) Spaltung mit Neuraminidase aus *Vibrio cholerae*:

Die Spaltung mit Neuraminidase aus *Vibrio cholerae* verläuft analog wie unter a.) S. 52 beschrieben, nur daß in diesem Fall das Substrat in mM CaCl_2 gelöst wird (da diese Neuraminidase im Gegensatz zum Enzym aus *Clostridium perfringens* zur Entfaltung der enzymatischen Aktivität Ca^{++} -Ionen benötigt (91)). Den pH-Wert der Lösung stellt man auf pH 6 ein. Qualitativ ergeben sich dünnschichtchromatographisch die gleichen Ergebnisse wie mit Neuraminidase aus *Clostridium perfringens*.

Wenn den Enzymen als Substrat die entsprechenden Per-O-Acetyl-Verbindungen der α -Benzyl-glykoside angeboten werden, ist nach 40 Stunden Stehenlassen bei 37° C und nach anschließender Dialyse, Entsalzung und Einengen des Dialysates keine Spaltung zu Per-O-Acetyl-N-acetyl- bzw. N(glykoly-O-acetyl)-neuraminsäure zu beobachten. Im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel H (Fließmittel: Butanol/Propanol/Wasser 1 : 2 : 1) bleibt beim enzymatischen Ansatz und bei der Kontrolle (ohne Enzym) der dem Per-O-Acetyl- α -benzyl-glykosid entsprechende Fleck unverändert bestehen. Das bedeutet also, daß die Per-O-Acetyl- α -benzyl-glykosid, der N-Acetyl- bzw. N-glykoly-O-acetyl-neuraminsäure nicht mit Neuraminidasen aus *Clostridium perfringens* und *Vibrio cholerae* spaltbar sind.

2 HCl-Spaltung der N-Acetyl- bzw. N-glykoly-O-acetyl-neuraminsäure- α -benzyl-glykoside.

1 mg N-Acetyl- bzw. N-glykoly-O-acetyl-neuraminsäure- α -benzyl-glykosid wird in 0,5 ml 0,1n HCl gelöst und 1 Stunde auf 80° C erwärmt. Nach Entsalzung und Einengung wird der Ansatz zusammen mit nicht gespaltenem N-Acetyl- bzw. N-glykoly-O-acetyl-neuraminsäure- α -benzyl-glykosid auf Cellulose-Dünnschichtchromatogrammen unter Benutzung des Fließmittels Essigester/Pyridin/Wasser 10 : 4 : 3 chromatographiert. Nach Anfärben mit Bial's Reagenz zeigt das Chromatogramm das Fehlen des dem α -Benzyl-glykosid entsprechenden Flecks. Stattdessen findet man eine an der Auftragstelle liegenbleibende Substanz, die als N-Acetyl- bzw. N-glykoly-O-acetyl-neuraminsäure identifi-

ziert werden konnte. In einem Vergleichschromatogramm (Fließmittel: Butanol/Pyridin/Wasser 6 : 4 : 3) wandern diese Substanzen mit denselben R_F -Werten wie kristallisierte N-Acetyl- bzw. N-glykoly-l-neuraminsäure.

3 Alkali-Behandlung der α -Benzyl-glykoside der N-Acetyl-neuraminsäure und ihrer entsprechenden Per-O-Acetyl-Verbindungen.

Bei Einwirkung von sowohl 1n NaOH als auch gesättigter Barium- und Calcium-hydroxyd-Lösungen während 24 Stunden in der Kälte und während 30 Minuten bei 45° C erweisen sich die α -Benzyl-glykoside der N-Acetyl- bzw. N-glykoly-l-neuraminsäure als stabil. Dagegen werden die Per-O-Acetyl-Verbindungen der Glykoside beim Erwärmen mit 1n NaOH auf 40-50° C während 15 Minuten und anschließendem 45-minütigen Stehenlassen bei 25° C vollständig zu den entsprechenden α -Benzyl-glykosiden verseift.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

=====

1. Es wurden α -Benzyl-glykoside von synthetisch gewonnener N-Acetyl- und N-Glykolyl-neuraminsäure dargestellt. Ausgehend von den Per-O-Acetyl-Derivaten der N-Acyl-neuraminsäuren, über die entsprechenden β -Acetochlor-Verbindungen mit Benzylalkohol und Silbercarbonat erhielt man die N-Acyl-D-neuraminsäure- α -benzyl-glykoside.
2. Auch aus den als Zwischenstufe der N-Acyl-D-neuraminsäure-Synthesen anfallenden γ -Lactonen wurde über die 6.7.8.9.-Tetra-C-acetyl-N-acetyl- bzw. N-(glykolyl-O-acetyl)-2-chlor-Verbindung, nach anschließender Lactonring-Öffnung ebenfalls das α -Benzyl-glykosid der N-Acyl-neuraminsäuren dargestellt.
3. Das 3-tert.-Butyloxycarbonyl- γ -lacton der N-Glykolyl-neuraminsäure, direkte Vorstufe des in der Synthese des Glykosids eingesetzten γ -Lactons, konnte erstmals kristallin isoliert werden. Durch Analysenwerte und IR-Spektrum konnte, die für diese Substanz von Kuhn und Bashang angenommene Struktur, bestätigt werden.
4. Die nur als stark hygroskopische Substanz, nicht kristallisierbar aber chromatographisch einheitlich erhaltenen α -Benzyl-glykoside wurden zur Charakterisierung in die kristallinen Per-O-Acetyl-Verbindungen übergeführt.
5. Die synthetisierten α -Benzyl-ketoside der N-Acyl-neuraminsäure erweisen sich als Substrate für Neuraminidasen aus *Vibrio cholerae* und *Clostridium perfringens*. Die bei der enzymatischen Spaltung freigesetzten N-Acyl-neuraminsäuren konnten chromatographisch identifiziert werden.

- 6 Nach der Per-O-acetylierung verlieren die α -Benzyl-ketoside die Eigenschaft der Spaltbarkeit durch Neuraminidase.
7. Die Michaelis-Menten-Konstante wurde bei Anwendung von gereinigter Neuraminidase aus *Clostridium perfringens* auf das α -Benzyl-glykosid der N-Acetyl-neuraminsäure bestimmt. Bei einem pH-Wert von 4,9 fanden wir eine K_M von $1,9 \cdot 10^{-3}$ Mol/l.
8. Die glykosidische Bindung der synthetisierten α -Benzyl-glykoside der N-Acyl-neuraminsäuren ist säurehydrolytisch spaltbar.
9. Gegen Alkali ist die α -ketosidische Bindung stabil. Die Per-O-Acetyl- α -benzyl-glykoside jedoch lassen sich schon durch mildes Alkali zu den entsprechenden α -Ketosiden verseifen.
10. Während die früher beschriebenen Methylketoside der Neuraminsäure sowie die natürlich vorkommenden Neuraminsäure-Glykoside keine Reaktion mit Thiobarbitursäure nach vorangegangener Perjodatspaltung geben (Aminoff-Methode), erweisen sich die α -Benzyl-glykoside der N-Acyl-neuraminsäuren unter den Versuchsbedingungen als weniger stabil. Sie ergeben bei dieser Methode eine colorimetrische Reaktion, die 16 % des Wertes der freien N-Acyl-neuraminsäure entspricht.

V. LITERATURVERZEICHNIS

=====

1. Eichwald, E.: Ann. Chem. Pharm. 134, 177 (1965)
Chem. Zentralbl., 209 (1966)
2. Koppe-Seyler, F.: Physiologische Chemie, Teil I, 94 (1977)
3. Schultze, H.E.: Dtsch. Wschr. 33, 1742 (1958)
4. Montreuil, J.: Bull. Soc. Chim. Biol. 39, Suppl. III (1957)
5. Meyer, K.: Advance in Protein Chem. II 249 (1955)
6. Gottschalk, A.: Biochem. J. 61, 298 (1965)
7. Graham, E.R.B. und Gottschalk, A.: Biochim. Biophys. Acta
39, 513 (1960)
8. Carlson, D.M.: J. Biol. Chem. 241, 2984 (1966)
9. Gottschalk, A.: Nature 170, 662 (1952)
10. Gottschalk, A.: Biochim. Biophys. Acta 23, 645 (1957)
11. Neuburger, A. und Marshall, R.D.: Biochemistry 3, 1596
(1964)
12. Gottschalk, A., Graham, E.R.B. und Murphy, W.H.: Biochim.
Biophys. Acta 71, 222 (1963)
13. Hashimoto, Y., Tsuiki, S., Nisizawa, K. und Pigman, W.:
Ann. N.Y. Acad. Sci. 106, 233 (1963)
14. Gottschalk, A. und Graham, E.R.B.: Biochim. Biophys. Acta
34, 330 (1959)
15. Gottschalk, A. und Murphy, W.H.: Biochim. Biophys. Acta
46, 31 (1961)
16. Kolén, L., Gregory, J. und Laurent, T.: Biochem. J. 21,
2 P (1964)
Muir, H.: Biochem. J. 62, 195 (1953)
17. Jeanloz, R.W.: Arthritis Rheumat. 3, 233 (1960)
18. Blix, G.: Z. physiol. Chem. 240, 43 (1936)
19. Blix, G.: Skand. Arch. Physiol. 80, 46 (1938)
20. Neubauer, O.: Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Morphologie
und Physiologie München (1907)
21. Ehrlich, P.: Dtsch. med. Wschr. 15 (1901)
22. Elson, L.A. und Morgan, W.T.J.: Biochem. J. 27, 1324 (1937)
23. Walz, E.: Z. physiol. Chem. 136, 210 (1927)

24. Levene, P.A. und Landsteiner, K.: J. Biol. Chem. 75, 687 (1927)
25. Klenk, E.: Z. physiol. Chem. 268, 50 (1941)
26. Klenk, E.: Z. physiol. Chem. 262, 128 (1939)
267, 128 (1940)
27. Klenk, E.: Z. physiol. Chem. 273, 76 (1942)
28. Klenk, E.: Z. physiol. Chem. 238, 216 (1951)
29. Blix, G., Svennerholm, L. und Werner, I.: Acta chem. scand. 6, 358 (1952)
30. Hirst, G.K.: Science 94, 22 (1941)
31. Hirst, G.K.: J. exp. Med. 76, 195 (1942)
32. Burnet, F.M., Mc Crea, J.F. und Anderson, S.G.: Nature (London) 160, 404 (1947)
33. Burnet, F.M.: Endeavour 14, 5 (1955)
34. Burnet, F.M.: Lancet 1, 7 (1948)
35. Gottschalk, A. und Lind, P.E.: Brit. J. Exp. Path. 30, 85 (1949) Nature (London) 164, 232 (1949)
36. Odin, L.: Nature (London) 170, 663 (1952)
37. Klenk, E. und Lauenstein, K.: Z. physiol. Chem. 291, 147 (1952)
38. Klenk, E. und Faillard, H.: Z. physiol. Chem. 298, 230 (1954)
39. Kuhn, R. und Brossmer, R.: Chem. Ber. 87, 123 (1954)
40. Klenk, E., Faillard, H., Weygand, F. und Schöne, H.H.: Z. physiol. Chem. 304, 36 (1956)
41. Klenk, E. und Uhlenbruck, G.: Z. physiol. Chem. 305, 224 (1956)
42. Klenk, E., Faillard, H. und Lemppfrid, H.: Z. physiol. Chem. 301, 235 (1955)
43. Blix, G., Lindberg, E., Odin, L. und Werner, I.: Acta Soc. Med. Upsaliensis 61, 1 (1956)
44. Klenk, E. und Uhlenbruck, G.: Z. physiol. Chem. 307, 266 (1957)
45. Yamakawa, I. und Susuki, S.: J. Biochem. 39, 175 (1952)
46. Blix, G., Lindberg, E., Odin, L., Werner, I.: Nature (London) 175, 340 (1955)
47. Gottschalk, A.: Nature (London) 176, 381 (1955)
48. Kuhn, R. und Brossmer, R.: Chem. Ber. 89, 2471 (1956)
49. Deuel, H. und Zweifel, G.: Helv. chim. Acta 39, 662 (1956)
50. Zilliken, F. und Glick, M.C.: Naturwissenschaften 43, 536 (1956)

51. Heimer, R. und Meyer, K.: Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.
42, 723 (1956)
52. Cornforth, J.W., Daines, M.E. und Gottschalk, A.: Proc.
chem. Soc. (London) 25 (1957)
53. Kuhn, R. und Brossmer, R.: Angew. Chem. 69, 534 (1957)
54. Comb, D.G. und Roseman, S.: J. Amer. Chem. Soc. 80, 497
(1958)
55. Comb, D.G. und Roseman, S.: J. Amer. Chem. Soc. 80, 3166
(1958)
56. Kuhn, R. und Brossmer, R.: Ann. Chem. 616, 221 (1958)
57. Kuhn, R. und Brossmer, R.: Angew. Chem. 74, 252 (1962)
58. Gottschalk, A.: Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 23,
645 (1957)
59. Gottschalk, A.: The chemistry and biology of sialic acids
and related substances, Cambridge University
Press, 1960
60. Overend, W.G., Rees, C.W. und Sequeira, J.S.: J. Chem.
Soc. 3429 (1962)
61. Heidt, L.J. und Purves, C.B.: J. Amer. Chem. Soc. 66,
1385 (1944)
62. Gottschalk, A.: Glykoproteins: Their composition, struc-
ture and function. Vol. 5, 193 (1966)
63. Karkas, J.D. und Chargaff, E.: J. Biol. Chem. 239, 949
(1964)
64. Burnet, F.M. und Stone, J.D.: Austr. J. Exper. Biol. Med.
Sci. 25, 227 (1947)
Popenoe, E.A. und Drew, R.M.: J. Biol. Chem.
228, 673 (1957)
Mohr, E. und Schramm, G.: Z. Naturforsch.
153, 568 (1960)
Ada, G.L., Freuch, E.L. und Lind, P.E.:
J. Gen. Microbiol. 24, 409 (1961)
65. Hirst, G.K.: J. Exper. Med. 75, 195 (1942)
Mayron, L.W., Robert, B., Winzler, R.J. und
Rafelson, M.E.: Arch. Biochem. Biophys. 92,
475 (1960)
66. Warren, L. und Spearing, C.W.: Biochem. Biophys. Res. Comm.
3, 439 (1960)
Ada, G.L. und Lind, P.E.: Nature (London)
190, 1169 (1961)

67. Trucco, R.E. und Caputto, R.: J Biol. Chem. 206, 901 (1954)
68. Heyworth, R. und Bacon, J.S.D.: Biochem. J. (London) 66, 41 (1957)
69. Kuhn, R. und Brossmer, R.: Angew. Chem. 68, 211 (1956)
Chem. Ber. 92, 1667 (1959)
70. Aminoff, D.: Biochem. J. 81, 384 (1961)
71. Meindl, P. und Tuppy, H.: Mh. Chem. 96, 302 (1965)
72. Koenigs, W. und Knorr, E.: Ber. dtsh. Chem. Ges. 34, 957 (1901)
73. Meindl, P. und Tuppy, H.: Mh. Chem. 96, 316 (1965)
74. Kuhn, R., Lutz, P. und Mac Donald, D.L.: Chem. Ber. 99, 2, 611 (1966)
75. Meindl, P. und Tuppy, H.: Mh. Chem. 97, 654 (1966)
76. Kuhn, R. und Bashang, G.: Ann. Chem. 659, 156 (1962)
77. Faillard, H. und Blohm, M.: Z. physiol. Chem. 341, 167 (1965)
78. Faillard, H., Kirchner, G. und Blohm, M.: Z. physiol. Chem. 347, 37 (1966)
79. Hall, N. Hynes, J.E. und Lapworth, A.: J. Chem. Soc. 107, 132 (1915)
80. Hill, H.B. und Cornelson, R.W.: Am. Chem. J. 16, 196, 291 (1894)
81. Faillard, H. und Segschneider, P.: Dissertation Bochum (1967) (unveröffentlicht)
82. Faillard, H. und Wirtz-Peitz, F.: Diplomarbeit Köln (1966) (unveröffentlicht)
83. Haynes, L.J. und Newth, F.J.: Advances in Carbohydrate Chem. 10, 207 (1955)
84. Kletz, L. und Lapworth, A.: J. Chem. Soc. (London) 101, 1254 (1915)
85. Gould, S.E.: Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie 446 (1962)
86. Viscontini, M., Hoch, D. und Karrer P.: Helv. Chim. Acta 38, 642 (1955)
87. Merck, E.: Chromatographie, 142
88. Dale, J.K.: J. Amer. Chem. Soc. 51, 2788 (1929)
89. Mohr, E. und Schramm, G.: Z. Naturforsch. 153, 568 (1960)

- Do. Lineweaver, H. und Burk, D.:J. Am. Chem. Soc. 56,
651 (1934)
91. Rosenberg, A., Binnie, E. und Chargaff, E.: ib. Soc.
82, 4113 (1960)

LEBENS LAUF

=====

Am 9. Mai 1941 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Oskar H. J. Blohm und seiner Ehefrau May, geb. Richter, in Rio de Janeiro - Brasilien geboren.

Von Februar 1947 bis Dezember 1953 besuchte ich die Schule "Colégio Visconde de Porto Seguro" in São Paulo. Im Dezember 1953 legte ich dort das Abitur ab.

Nach bestandener Aufnahme-Prüfung nahm ich im Februar 1959 das Studium der Chemie an der Universität São Paulo auf. Im Dezember 1962 erhielt ich das Diplom für Chemie von der Universität São Paulo (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras).

Im April 1963 kam ich nach Deutschland mit einem Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).

Nach Anfertigung einer Diplomarbeit im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln bei Herrn Prof. Dr. Faillard über die "Synthese der N-Glykolylnneuraminsäure" begann ich im März 1965 im Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum mit den Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation.

Meinem sehr verehrten Lehrer Herrn Professor
Dr. H. Faillard danke ich herzlich für die
Anregung zu dieser Arbeit und für die för-
dernde Anteilnahme bei ihrer Ausführung.

